

Interacción celular en la eritropoyesis

Benet Nomdedeu i Tobella

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

" I N T E R A C C I O N C E L U L A R
E N L A E R I T R O P O Y E S I S "

=====

T E S I S D O C T O R A L

BENET NOMDEDEU I TOBELLA

Barcelona, maig de 1982

T A B L A VI

CO-CULTIVO CON MONOCITOS Y GRANULOCITOS

F-III (sóla)	29 ± 14 colonias/10 ⁵ células de F-III
F-III + monocitos (30%)	1 ± 0 5 colonias/10 ⁵ células de F-III
F-III + granulocitos (30%)	28 ± 10 colonias/10 ⁵ células de F-III

(N 3)

Los siguientes experimentos fueron realizados para determinar si el efecto de supresión monocitaria sobre el crecimiento de BFU-E requería un contacto directo célula-célula. A tal fin, fueron preparados "monolayers" de monocitos por medio de la adición de proporciones distintas de células de fracción IV a micro-pocillos de cultivo, suspendidas en RPMI-20% de suero autólogo, permitiendo la adherencia de los monocitos al plástico por espacio de una hora. Células de fracción III sólo o con monocitos fueron cultivadas en micro-pocillos separados usando el sistema de coágulo de plasma. El sobrenadante de los "monolayers" monocitarios fue extraído y coágulos plasmáticos conteniendo células de fracción III y eritropoyetina fueron transferidos sobre los "monolayers" monocitarios ó en pocillos de control (conteniendo tan sólo RPMI-20% de suero autólogo). Sumariamente, la proliferación de BFU-E fué estudiada en coágulos plasmáticos conteniendo

- a) células de fracción III sólo
- b) monocitos células de fracción III
- c) coágulos plasmáticos conteniendo fracción III dispuestos posteriormente sobre "monolayers" monocitarios

Los monocitos suprimieron la actividad de BFU-E tanto en el co-cultivo con fracción III como en su presencia en los "monolayers" (Tabla VII)

T A B L A VII

EFEECTO DE LOS MONOCITOS SOBRE LA FORMACION DE COLONIAS ERITROIDES DERIVADAS DE BFU-E INFLUENCIA DE LA PROXIMIDAD DE LOS MONOCITOS A LAS CELULAS DE FRACCION-III (1)

% de monocitos	F-III + monocitos ⁽²⁾ (co-cultivo)	F-III + monocitos ⁽³⁾ (monolayer)
0	23 ± 10	23 ± 10
10	4 ± 2	15 ± 6
20	0.5 ± 0.5	12 ± 7
30	0.5 ± 0.5	3 ± 2

(1) Se cultivaron 2×10^6 células de fracción III, con 4 U I de Ep

(2) Los monocitos y las células de fracción III fueron mezcladas y posteriormente cultivadas a lo largo de 14 días. Estos valores representan la media ± el error standard de tres experimentos separados.

(3) Las células de fracción III fueron cultivadas en micropocillos con medio de cultivo completo, lográndose a constituir el coágulo plasmático antes de ser transferidas a otros micro-pocillos que contenían los "monolayers" monocitarios.

Diversos investigadores han reportado que las BFU-E presentes en las fracciones celulares de la interfase de gradientes isopícnicos proliferaron sin necesidad de recurrir a la deplección previa de monocitos (22,47,97,104) Para determinar si el tiempo de centrifugación de los gradientes y/o la temperatura podían influenciar la concentración de monocitos resultante en la suspensión celular final, fueron realizados los siguientes experimentos previa dilución, la sangre fué dispuesta sobre gradientes de ficoll-hypaque ó de ficoll-paque, siendo posteriormente centrifugada por períodos de tiempo distintos (25' ó 40') y a temperaturas distintas (15°C ó 25°C) El incremento del tiempo de centrifugación ó de la temperatura determinaron deplección de monocitos en una proporción de 2-4 veces (Tabla VIII) Una vez más, se demostró una estrecha correlación entre el número de colonias derivadas de BFU-E y el porcentaje de monocitos presente en la suspensión celular cultivada

T A B L A VIII

EFFECTO DE LA TEMPERATURA, TIEMPO DE CENTRIFUGACION Y TIPO DE FICOLL EN EL CONTENIDO MONOCITARIO Y PROLIFERACION DE BFU-E DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA (1)

Condiciones de separación	% monocitos (morfología) ⁽²⁾	% monocitos (Sudán negro) ⁽²⁾	Nº de BFU-E/ 10 ⁵ cél ⁽²⁾
<u>Ficoll-Hypaque</u> ⁽³⁾			
25 min , 15°C	18 ± 2	22 ± 1	2 ± 0 4
40 min , 25°C	4 ± 3	7 ± 2	13 ± 3
<u>Ficoll-Paque</u> ⁽⁴⁾			
25 min , 15°C	16 ± 3	18 ± 1	2 ± 0 5
40 min , 25°C	6 ± 1	9 ± 1	8 ± 2

(1) Ver texto para explicación

(2) Cada valor representa la media ± 1 error standard de tres estudios por separado

(3) Preparado en el laboratorio a partir de Hypaque comprado a Winthrop Labs , N Y , N Y (ver material y métodos)

(4) Comprado a Pharmacia Chemicals, Piscataway, N J , en forma de solución de uso directo

5 2 EFECTO DE LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS T Y B SOBRE LA ERITROPOYESIS "IN VITRO" (Ubicación de la BFU-E presente en la sangre periférica dentro de las poblaciones linfocitarias Papel desarrollado por estas poblaciones en el crecimiento "in vitro" del precursor)

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que el cultivo en el sistema de coágulo de plasma de concentraciones celulares estándar para fracción III (habitualmente $1-2 \times 10^6$ células /1 l ml de medio de cultivo) de fracciones celulares T-depleccionada y/ó null (no-T, no-B) de células mononucleares de sangre periférica, dieron lugar a la formación de tantas colonias eritroides derivadas de BFU-E que el crecimiento se hacia convergente, imposibilitando en la práctica el contaje de su número. Por ello, se hizo preciso el empleo de concentraciones celulares en cultivo oscilantes entre 0.25×10^6 /1 l ml (para fracciones celulares no-T, "null" así como depleccionadas de monocitos) y 3×10^6 células /1 l ml (otras fracciones de células mononucleares), determinándose en la lectura de resultados el número de colonias eritroides por cada 1×10^5 células cultivadas. Las concentraciones de eritropoyetina en el medio de cultivo, en función de la curva dosis-respuesta previamente establecida, fueron, como en las experiencias anteriormente referidas, de 4 U I /1 l ml de medio de

cultivo

Los resultados que se muestran en la Tabla IX demostraron que

- a) Como se evidenció previamente (ver tabla I), el cultivo de células mononucleares procedentes de sangre periférica (obtenidas a través de gradientes de ficoll), dió lugar a la formación de colonias eritroides (sintetizadoras de hemoglobina) en número apreciable
- b) El cultivo de fracciones de células mononucleares previamente depleccionadas de células T (macro-rosetting) a concentraciones similares, dió lugar a la formación de colonias eritroides en número significativamente mayor ($p < 0.05$) (Figura 24)
- c) El tamaño y madurez de las colonias obtenidas a partir de fracciones celulares depleccionadas de células T, fueron similares a los observados en el crecimiento obtenido a partir de la preparación de células mononucleares "integras". A fin de objetivar cuantitativamente este dato, se empleó la determinación del número de sub-colonias eritroides que constituía la unidad de crecimiento conocida como colonia derivada de BFU-E
- d) Sin embargo, cuando los resultados se calcularon en base al número total de células no-T cultivadas en cualquier fracción, no se hallaron dife-

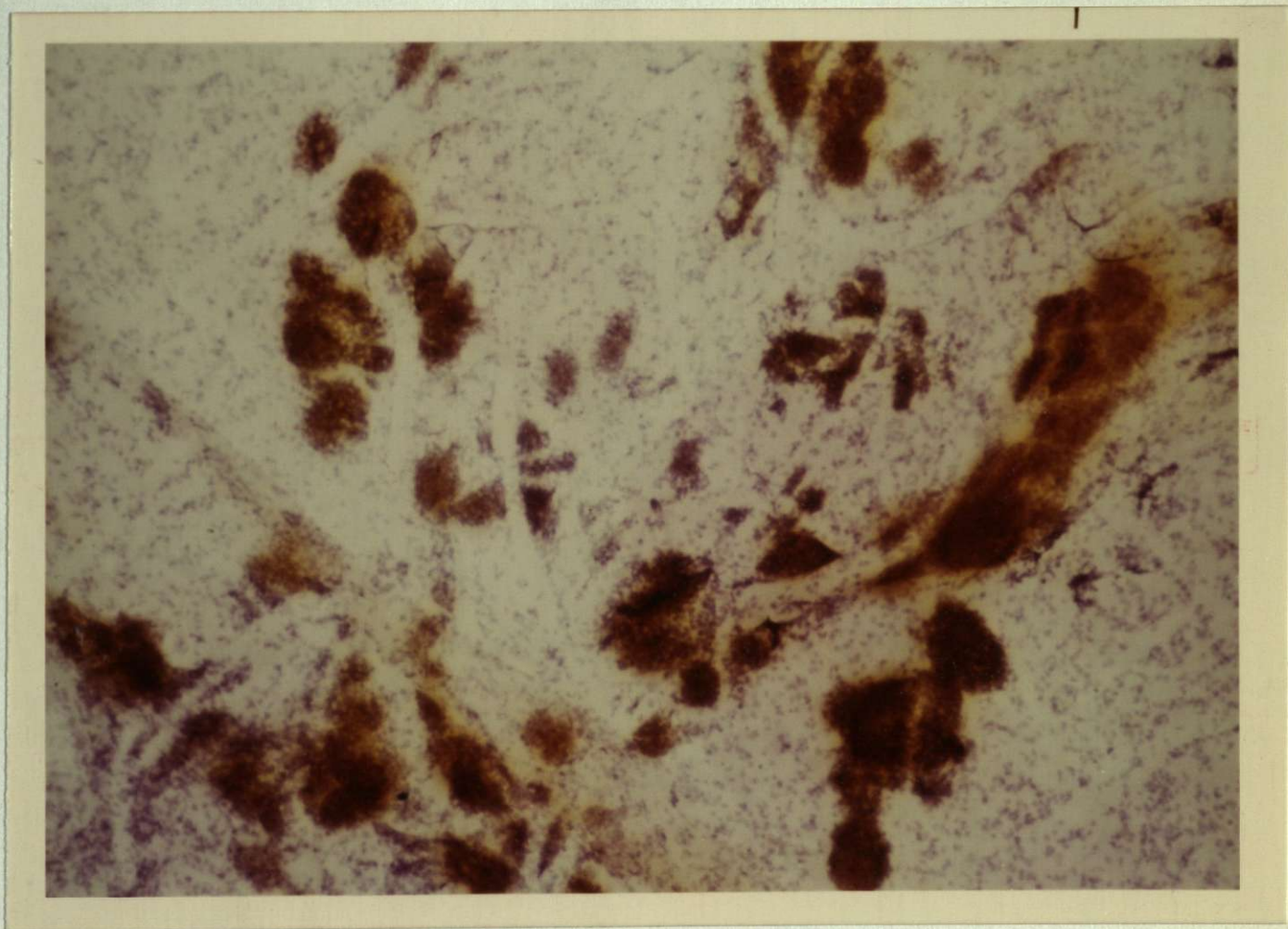


FIGURA 24: Actividad proliferativa correspondiente a fracción celular linfocitaria no-T de sangre periférica (x 40).

rencias significativas entre las distintas fracciones

- e) La adición de células T en proporciones crecientes al cultivo de la fracción deplecionada de células T, no influyó significativamente en el número ni el tamaño de las colonias eritroides formadas

FORMACION DE COLONIAS ERTROIDES DERIVADAS DE BFU-E A PARTIR DEL CULTIVO "IN VITRO" DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA EFECTO DE LOS LINFOCITOS T (1)

Nº de colonias /10⁵ cél.

Fracción celular	% Linfocitos T	Fracción	Cél -- No T (2)	Subunidades/colonia
C Mononucleares (6) ⁽³⁾	78 ± 4	15 ± 3	68 ± 13	5 8 ± 0 6
Linfocitos T (6)	-	2 ± 1	-	-
C MN - T (6)	4 ± 1	53 ± 11	55 ± 11	5 6 ± 0 6
C MN + 20% T ⁽⁵⁾ (6)	-	39 ± 7	49 ± 8	4 9 ± 0 3
C MN + 40% T (5)	-	27 ± 4	45 ± 6	5 7 ± 0 4
C MN + 80% T (6)	-	11 ± 2	55 ± 10	6 2 ± 0 8

(1) Concentración de Ep en cultivo 4 U I /1 l ml de medio Día de lectura del cultivo + 14

(2) Valor del número proporcional de colonias que corresponderían al número de células no-T presentes en el cultivo, asumiendo que en esta fracción (no-T) se ubica la BFU-E

(3) La numeración entre parentesis indica el número de estudios por separado realizados

(4) Cada valor representa la media ± 1 error standard del total de estudios realizados

(5) Representa el porcentaje de linfocitos T en el cultivo

Abreviaciones C MN células mononucleares, C MN - T células mononucleares depleccionadas de linfocitos T, T linfocitos T

Como ha quedado expuesto en el primer apartado de los resultados, los monocitos ejercen un bien definido efecto inhibitorio en el crecimiento de las colonias eritroides correspondientes a BFU-E. Por ello, la previa separación de los monocitos en la suspensión de células mononucleares de sangre periférica supone un incremento significativo en el número de colonias eritroides formadas "in vitro" en presencia de eritropoyetina. La tabla X muestra los resultados de varios estudios en los que, previa deplección de monocitos de las suspensiones mononucleares de sangre periférica (Fracción-III), se procedió al cultivo de esta fracción, bien íntegramente, bien tras la separación de los linfocitos T por medio de la técnica de rosetas espontáneas con hematíes de carnero pre-tratados con AET (vease detalles de la técnica en el capítulo de material y métodos). Los resultados permitieron observar una vez más que a concentraciones similares de células en el cultivo, la fracción celular carente de células T produjo un mayor número de colonias eritroides. Este incremento mostró estrecha relación con el incremento de la concentración de BFU-E consiguiente a la deplección de linfocitos T. Del mismo modo, el posterior co-cultivo de esta fracción enriquecida en BFU-E con linfocitos T a concentraciones progresivas no incrementó el número ni la calidad de crecimiento de las colonias eritroides.

FORMACION DE COLONIAS ERITROIDES DERIVADAS DE BFU-E A PARTIR DEL CULTIVO "IN VITRO" DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA PREVIAMENTE DEPLECCIONADA DE MONOCITOS (F-III) EFECTO DE LOS LINFOCITOS T

Nº colonias / 10⁵ células

Fracción celular	% linfocitos T	Fracción	cel no-T (2)	Subunidades de colonia
Fracción III (8) (3)	80 ± 2.5 (4)	25 ± 3	125 ± 15	6 3 ± 0 4
Linfocitos T (8)	-	3 ± 1	-	-
F-III - T	8 ± 2.5	126 ± 11	136 ± 12	6 8 ± 0 7
F-III - T + 20% T (6) (5)	-	100 ± 9	125 ± 11	6 2 ± 0 5
F-III - T + 40% T (7)	-	90 ± 7	150 ± 12	5 7 ± 0 2
F-III - T + 80% T (7)	-	29 ± 6	145 ± 30	6 1 ± 0 9

- (1) Concentración de Ep en cultivo 4 U I / 1 ml de medio Día de lectura del cultivo +14
- (2) Valor del número proporcional de colonias que corresponderían al número de células no-T presentes en el cultivo, asumiendo que en esta fracción (no-T) se ubica la BFU-E
- (3) La numeración entre paréntesis indica el número de estudios por separado realizados
- (4) Cada valor representa la media ± 1 error standard del total de estudios realizados
- (5) Representa el % de linfocitos T en el cultivo

Abreviaciones F-III 1% de monocitos, F-III -T Fracción III depleccionada de linfocitos T, T linfocitos T.

Ciertos autores (97) han referido la existencia de un efecto "T-helper" como necesario y determinante en el crecimiento y maduración de las colonias eritroides derivadas de la BFU-E presente en la sangre periférica. Nuestra experiencia en cultivo de fracciones celulares desprovistas de células T, ya referida anteriormente (tablas IX y X), parecía contradecir las citadas observaciones. A fin de verificar de forma más precisa este importante punto, así como para identificar la fracción mononuclear en la que se ubica la BFU-E, a partir de células mononucleares desprovistas de monocitos (fracción III) procedimos a un subfraccionamiento en

- a) Fracción celular enriquecida en linfocitos B (adherente a columna de sefarosa conteniendo anti-inmunoglobulina humana. Vease detalles en el capítulo correspondiente de material y métodos)
- b) Fracción celular enriquecida en linfocitos T (formadoras de rosetas con hematíes de carnero)
- c) Fracción celular "null" (no-T, no-B)

Estas fracciones fueron estudiadas acerca de su capacidad para la formación de colonias eritroides en el sistema de coágulo de plasma y en presencia de eritropoyetina, bien solas, bien en co-cultivo entre ellas. La tabla XI muestra claramente como las fracciones por

tadoras de marcadores T y/ó B no mostraron capacidad para dar lugar a un crecimiento valorable de colonias eritroides. Al contrario, la fracción mononuclear desprovista casi totalmente de monocitos (fracción III) mostró actividad eritroide en el cultivo (29 colonias / 10^5 células cultivadas) aunque significativamente inferior a la actividad expresada por la fracción "null" (no-T, no-B) (106 colonias / 10^5 células cultivadas) ($p < 0.001$). Ello argumenta de forma muy consistente a favor de que la citada fracción celular "null" acoge en su contenido a los precursores BFU-E (Figuras 25 y 26)

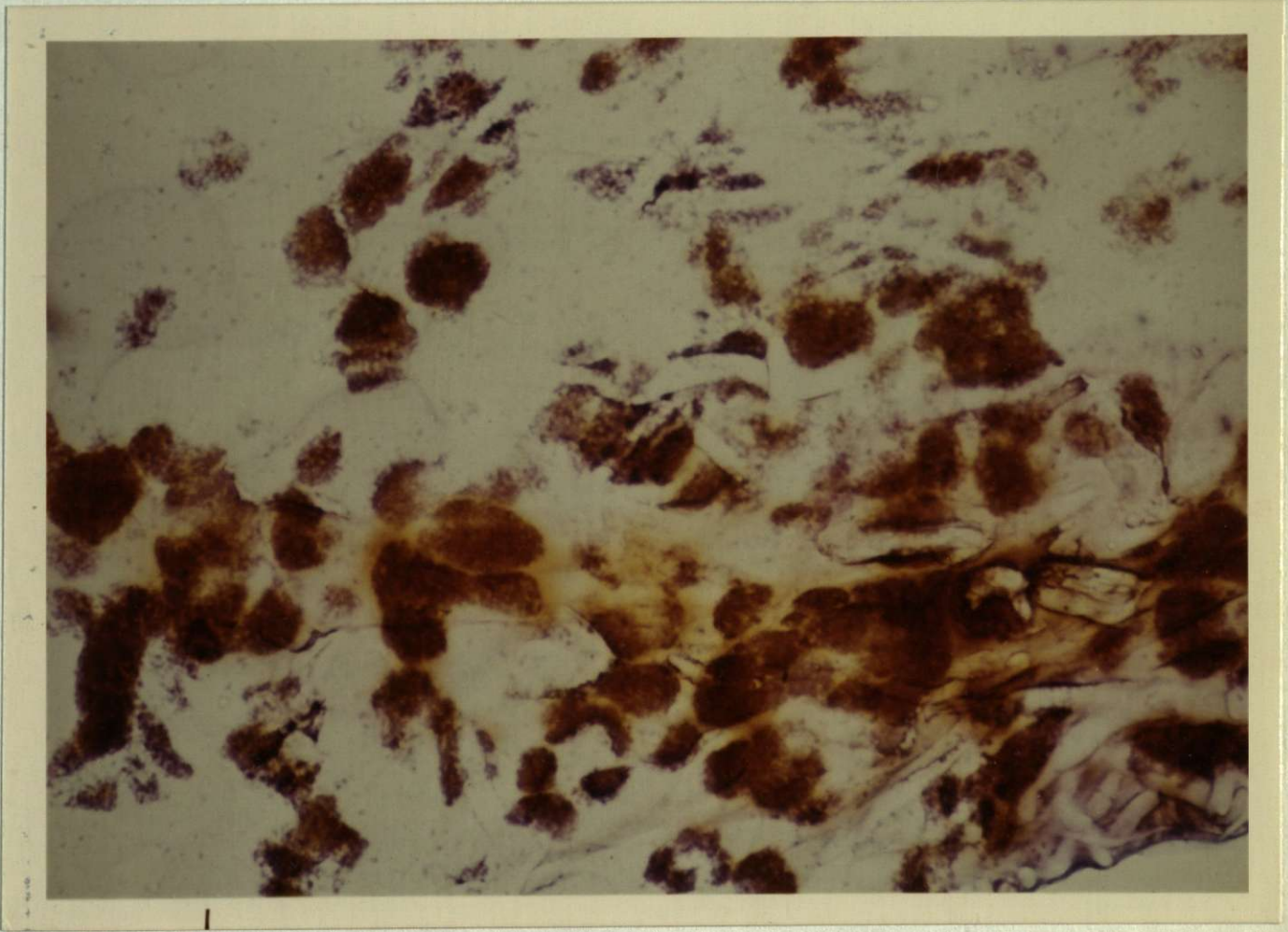


FIGURA 25: Actividad proliferativa correspondiente a fracción celular linfocitaria "null" de sangre periférica (~1% de linfocitos T) (x 40).

TABLA XI

FORMACION DE COLONIAS BIFENOTIPICAS INDICADAS EN 1964 Y 1965 EN EL CULTIVO "IN VITRO" DE SUBCULTIVACIONES SUCESIVAS DE CELULAS MONONUCLEARES DE ORIGEN DE LINFOCITOS HEMATOBLASTICOS DE

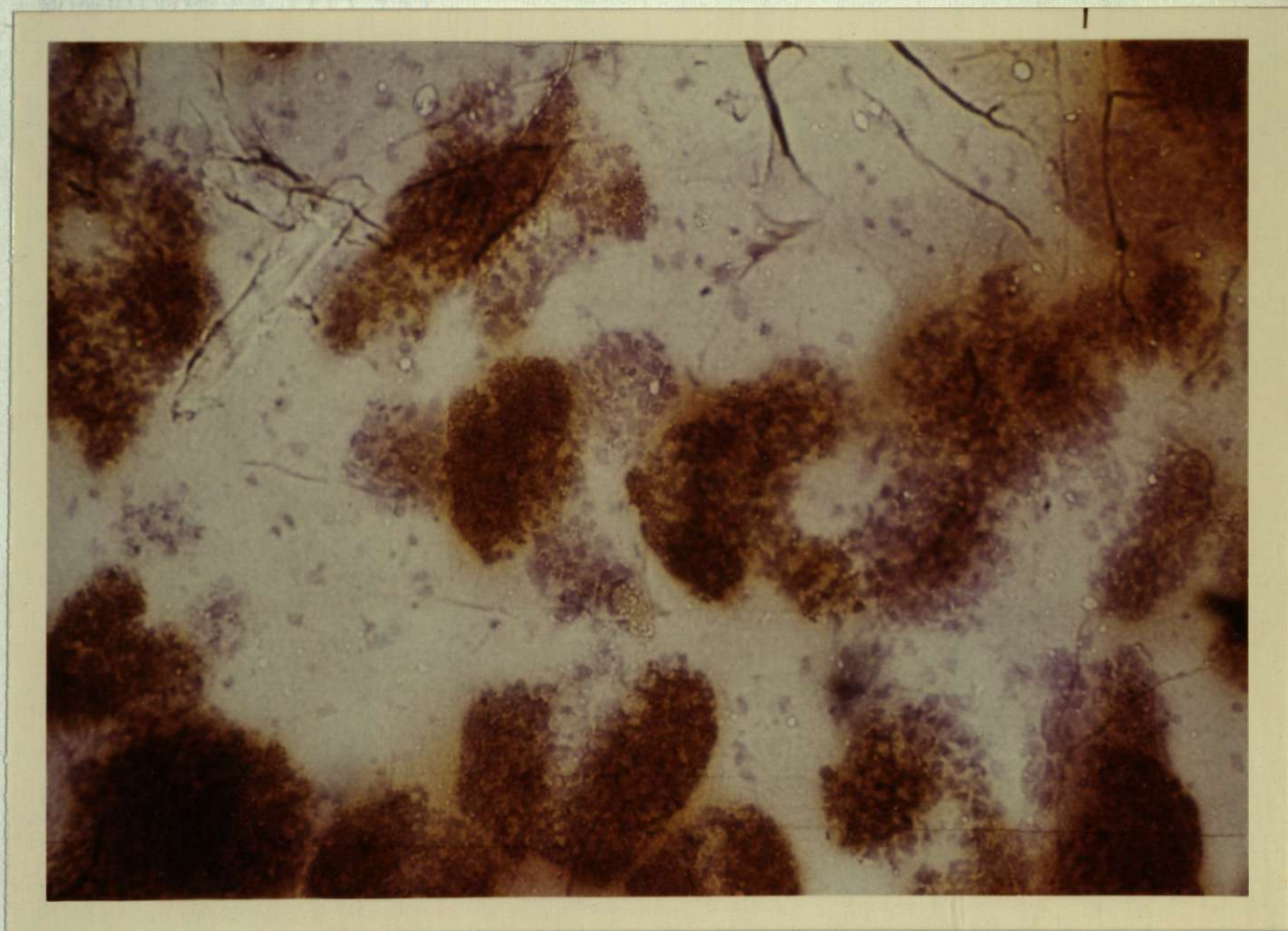


FIGURA 26: A mayor detalle, actividad proliferativa de BFU-E correspondiente a la fracción celular linfocitaria "null"

T A B L A XI

FORMACION DE COLONIAS ERITROIDES DERIVADAS DE BFU-E A PARTIR DEL CULTIVO "IN VITRO" DE SUB-POBLACIONES PURIFICADAS DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA DEPLECCIONADAS DE MONOCITOS (F-III) (1)

Fracción celular	% Linfocitos T	% Monocitos	Nº de colonias/ 10 ⁵ células
Fracción III (7) ⁽²⁾	80 ± 3 ⁽³⁾	0 9 ± 0 1	29 ± 5
Linfocitos T (7)	85 ± 2	0 3 ± 0 2	0
Linfocitos B (7)	15 ± 4	0 5 ± 0 5	4 ± 1
Linfocitos "null" (8)	1 ± 0 5	1 0 ± 0 3	106 ± 13

(1) Concentración de Ep en cultivo 4 UI/1 l ml de medio
Día de lectura del cultivo +14

(2) La numeración entre paréntesis indica el número de estudios por separado realizados

(3) Cada valor representa la media ± 1 error estándar del total de estudios realizados

Como queda manifiesto en la tabla XI, en los distintos experimentos por separado, la fracción "null" contenía una media de tan sólo un uno por ciento de linfocitos T formadores de rosetas espontáneas con hematíes de carnero. La tabla XII muestra como la re-combinación en co-cultivo de la fracción "null" con proporciones varias de fracciones autólogas purificadas T ó B, ó con ambas a la vez (reconstituyendo aproximadamente las proporciones fisiológicamente existentes en la sangre periférica), no permitió en ningún caso observar cambios significativos en la cantidad (número de colonias) ó el tamaño (expresado a través del número de subunidades constituyentes) del crecimiento de colonias eritroides derivadas de la BFU-E, comparativamente con el crecimiento observado a partir de la fracción "null" cultivada separadamente. Del mismo modo, la calidad de las colonias eritroides en cuanto a hemoglobinización fué similar

T A B L A XII

EFEECTO DE LA ADICION DE LINFOCITOS AUTOLOGOS PURIFICADOS T Y/O B SOBRE LA FORMACION DE COLONIAS ERITROIDES DERIVADAS DE BFU-E POR FRACCION CELULAR "NULL" PURIFICADA, EN EL SISTEMA DE COAGULO DE PLASMA "IN VITRO" (1)

Fracción celular	Nº colonias/10 ⁵ células "null"	Subunidades/colonia
Fracción "null" (6) ⁽²⁾	113 ± 10 ⁽³⁾	5 3 ± 0 3
F "null"+Linfocitos T (10-80%) (6) ⁽⁴⁾	110 ± 16	4 4 ± 0 2
F "null"+Linfocitos B (10-80%) (3)	115 ± 21	5 5 ± 0 2
F "null"+Linfocitos T (80%)+Linfocitos B (10%) (3)	103 ± 12	4 5 ± 0 2

- (1) Concentración de Ep en cultivo 4 U I /1 l ml de medio
Día de lectura del cultivo + 14
- (2) La numeración entre paréntesis indica el número de estudios por separado realizados
- (3) Cada valor representa la media ± 1 error standard del total de estudios realizados en cada categoría
- (4) Los valores de porcentaje entre paréntesis indican el porcentaje de cada tipo celular en cultivo

6 D I S C U S S I O N

=====

6 D I S C U S I O N

Desde una perspectiva simplificadora, el mecanismo fundamental en la regulación de la eritropoyesis viene ejercido por la acción de la eritropoyetina, hormona cuyo estímulo de producción específico es la hipoxia tisular ejercida sobre determinados órganos "receptores". Sin embargo, un análisis más profundo lleva a la consideración de otros mecanismos de regulación que, no por menos conocidos dejan de ejercer un papel fundamental en la dinámica de producción y maduración de la serie roja. Entre ellos, los fenómenos de interacción celular ocupan un espacio preferente. El primer ejemplo de ello viene dado por el denominado "microambiente inductivo hemopoyético" ("HIM") (135), implicado estrechamente en la regulación del proceso por el que la stem cell pluripotente CFU-S se diferencia hacia cada uno de los compartimentos "comitted" correspondientes a las futuras líneas madurativas de la sangre.

Dentro del compartimento eritropoyético, y a través del modelo experimental que propician las técnicas de cultivo "in vitro" de la serie (125), se pudo comprobar la existencia de factores de estimulación sobre la producción de colonias eritroides distintos a la eritropoyetina, dependientes de la presencia en el cultivo de otras células (52,53) ó medios condicionados provenientes del sobrenadante de cultivos de lí-

neas celulares sin aparente relación con la serie roja (6,40,97) Publicaciones más recientes (88) sintetizan este efecto de estimulación eritropoyética bajo el término "burst promoting activity" ("actividad promotora de burst"), incluyendo en ella orígenes dispares, tales como células de médula ósea de ratón (142), factores presentes en orina humana distintos a la eritropoyetina (33), medios condicionados leucocitarios (6), y linfocitarios previa estimulación con toxoide tetánico (97), fitohemaglutinina (35,88), ó pokeweed mitogen (60)

En principio, es muy difícil establecer diferencias entre los factores de interacción celular a través de los que el "HIM" ejerce su función, de aquellos que se incluyen dentro del heterogéneo grupo que parece constituir la denominada "burst promoting activity" (BPA) Es posible que algunos de ellos se superpongan

Determinados experimentos, a través de modelos "in vivo" (56) e "in vitro" (58), han permitido establecer de forma cierta que el precursor eritropoyético "precoz", BFU-E, primero de los conocidos en la secuencia "committed" a maduración eritroide y supuesto inmediato sucesor de la CFU-S pluripotente, no se halla bajo la dependencia reguladora de la eritropoyetina, que se inicia en estadios madurativos más avanzados, intermedios entre la BFU-E y el precursor "tardío" CFU-E De ahí que en el estudio de las condicio-

nes reguladoras del crecimiento de BFU-E, la interacción celular asuma un protagonismo fundamental. En este sentido, Nathan y cols (97) describieron, a través del cultivo de BFU-E presente en la sangre periférica de humanos sanos, la obligada presencia de linfocitos T en el cultivo para que el precursor consumara su maduración hasta colonias de células con capacidad de sintetizar hemoglobina. Sin embargo, la discusión de nuestros resultados se genera en el efecto supuestamente más simple por el que los monocitos inhiben la formación de colonias eritroides derivadas de BFU-E, que describimos en esta tesis y que no fue observado por investigadores que tuvieron la oportunidad, antes que nosotros, de obtener crecimiento de BFU-E a partir de células mononucleares de sangre periférica, en las que existía sin ningún género de dudas un componente variable de monocitos, que no fué cuantificada (22,47,97,104).

En forma resumida, los resultados de nuestra tesis muestran, en primer lugar, que los monocitos ejercen un efecto supresor específico sobre el desarrollo "in vitro" de colonias eritroides a partir de las BFU-E circulantes, precursores que, en una segunda fase del estudio, se separan dentro de la fracción "null" de los linfocitos de la sangre periférica, mostrando capacidad para generar colonias "in vitro" independientemente, en cuanto a cantidad ó calidad del crecimien-

to, de la presencia ó ausencia de las poblaciones linfocitarias caracterizadas por la presencia de marcadores T (rosetas espontáneas) ó B (inmunoglobulinas de superficie)

En el primer apartado de nuestros resultados, los monocitos humanos ejercen un efecto supresor sobre la formación de colonias eritroides, siendo este efecto directamente proporcional al número de monocitos presentes en el cultivo. La búsqueda de posibles explicaciones al fenómeno descrito, nos llevó al desarrollo de distintas hipótesis, de menor a mayor complejidad, comportando en cada caso, una prospección concreta a través del uso del mismo modelo experimental. En primer lugar, la posibilidad de una simple dilución del número final de BFU-E en la preparación cultivada se descartó dado que la reducción de un porcentaje determinado de células mononucleares no-adherentes, si fueron cultivadas solas, significó la reducción del número de colonias en un porcentaje similar, mientras que la presencia en cultivo de porcentajes entre quince a veinte por ciento de monocitos ya supuso la supresión absoluta del crecimiento eritroide. Del mismo modo, el cultivo de cantidades fijas de células no-adherentes con cantidades variablemente progresivas de monocitos mostró el citado efecto inversamente proporcional del número de monocitos sobre el número de colonias eritroides que crecieron. El cálculo

lo del número de colonias en función de 10^5 células no-adherentes cultivadas muestra una vez más el efecto supresor mediatizado por los monocitos

Dada la metodología aplicada en la obtención de la supresión enriquecida de monocitos (fracción IV), la supresión podría explicarse a través de un efecto tóxico de la lidocaina sobre la BFU-E. Aunque la hipótesis en principio podría descartarse por la presencia del efecto inhibitor en fracciones mononucleares post-ficoll con un número suficiente de monocitos, sin mediatización de lidocaina en ninguna etapa metodológica previa al cultivo, la práctica de co-cultivo con linfocitos T y/o B pre-tratados con lidocaina tampoco mostró el efecto supresor

Otra posibilidad a descartar era la hipótesis del consumo directo de la eritropoyetina por parte de los monocitos, previa a su utilización por parte de los precursores ó en competición con ella. Esta posibilidad arroja de entrada escasa verosimilitud, dado que en el medio de cultivo se emplearon dosis de eritropoyetina muy por encima de las mínimas eficientes mostradas por la curva de dosis-respuesta, sin que ello interfiera con el efecto supresor. Sin embargo, a efectos de una mayor objetividad en nuestros razonamientos, se demostró como la incubación de eritropoyetina con monocitos, a corto ó largo plazo, no comportó un consumo significativo de la hormona

Por último, la eventual posibilidad de un efecto supresor de carácter inespecífico, por la simple circunstancia técnica del co-cultivo, fué obviada ante la ausencia del efecto supresor ante cantidades similares de granulocitos en el cultivo

Los monocitos pueden ejercer su efecto supresor a través de la secreción de productos humorales que afecten al desarrollo de la BFU-E. En este sentido, macrófagos de ratón han mostrado capacidad para segregar chalonas, cito-toxinas y prostaglandinas, capaces todas ellas de interferir la proliferación de precursores celulares no-eritroides (91,138). En nuestra experiencia, la adición al cultivo de medio condicionado sobrenadante del cultivo de monocito por 4-12 días, no sólo no significó supresión del crecimiento sino que, contrariamente, incrementó la proliferación y diferenciación de las colonias eritroides formadas. Ello concuerda con la aportación de Aye (6) pudiendo incluirse este efecto dentro de la "BPA". De todas formas, los experimentos que llevamos a cabo evidenciando efecto supresor por parte de los monocitos, tanto si son mezclados con la fracción no-adherente previamente al cultivo como si están presentes en él como "monolayer", sugirieron que los monocitos no requieren de un contacto celular directo con la BFU-E para ejercer su efecto. Ello comporta la hipótesis de que el efecto que describimos se realizaría a través de un factor

humoral de efecto local y vida corta en el medio de cultivo Su posible filiación como efecto prostaglandínico parece descartarse puesto que, la presencia de indometacina en el cultivo no suprimió el efecto de los monocitos

Varios investigadores han referido, previamente a nosotros, la presencia de BFU-E en sangre periférica, usando procedimientos de separación celular (gradientes de ficoll) y de cultivo (coágulo de plasma) similares a los que hemos empleado en esta tesis Ninguno de ellos hizo referencia al efecto supresor de los monocitos que describimos En ningún caso se citó la concentración de monocitos viable presente en los cultivos, aspecto que en nuestra tesis queda consignado tanto por controles morfológicos (Giemsa), como por citoquímicos (Sudán negro) y funcionales (fagocitosis de partículas de látex) así como evidencia de viabilidad celular previa al cultivo (Tripán blue) Como queda evidenciado, en nuestra fracción I se emplearon condiciones especiales que permitieron la preservación de un número relativamente constante de monocitos en la suspensión mononuclear Es obligado señalar que detalles técnicos de aparente intrascendencia influyen decisivamente en la presencia de monocitos tras la práctica de gradientes de ficoll Así, el uso de la sangre en un periodo de tiempo superior a una hora después de su extracción, el empleo de medios conte-

niendo iones divalentes Ca^{++} y Mg^{++} , y el incremento en el tiempo o la temperatura de centrifugación del gradiente, influyen decisivamente condicionando deplección de monocitos

Papayannopoulou y cols (104) emplearon en sus experimentos células mononucleares que habían sido sometidas a adherencia en plástico por dos horas, lo que indudablemente tuvo que suponer deplección monocitaria. Los resultados de rendimiento de número de colonias reportados por Clarke y cols (22) y Nathan y cols (97) coinciden con el obtenido en suspensiones mononucleares con un 6-12% de monocitos, concentración habitualmente reportada en la práctica de gradientes sin precauciones especiales destinadas a la preservación de monocitos, superponiéndose asimismo con nuestros resultados correspondientes al estudio preliminar (ver tabla I)

Es pues evidente que un número variable de monocitos puede explicar la disparidad de resultados en cuanto al número de colonias obtenidas por los distintos investigadores en relación a un número dado de células cultivadas ó a un volumen concreto de sangre. En nuestra experiencia, la presencia de un número mínimo de monocitos supone un menor margen de variabilidad en el número de colonias obtenidas. Recientemente, otros investigadores (45) han reportado un comportamiento variable en la presencia de BFU-E y CFU-C en

sangre periférica Dado el más que probable papel de redistribución que ejerce el precursor circulante, a tendiendo a las necesidades de determinadas áreas de la hemopoyesis que han sufrido deplección por cualquier circunstancia, es muy difícil polemizar sobre el fenómeno de variabilidad en el recuento de precursores circulantes, ya que con toda seguridad en él inciden múltiples variables, tanto de carácter fisiológico (muchas de ellas aún desconocidas) como de tipo técnico (eritropoyetina usada, medio de cultivo, e incluso técnica de recuento de colonias por parte de los distintos investigadores)

Diversas observaciones "in vivo" e "in vitro" han sugerido que los monocitos-macrófagos pueden estar relacionados con la regulación de la hemopoyesis. Previamente en esta discusión, hemos hecho referencia al "HIM" (135). La anemia de carácter genético propia de la cepa de ratones Steel es atribuida a un defecto en el "HIM" (86). El carácter de resistencia a las radiaciones ionizantes que caracteriza al "HIM" sugiere su pertenencia al sistema reticulo-endotelial. El fenómeno denominado de "resistencia híbrida" ó "repre-sión de CFU-S" (26,80) se hace aparente en animales altamente irradiados, no se incrementa tras la inmunización y es improbable que afecte a los linfocitos B. Lotzova y cols (75) han implicado en él a los macró-fagos, habida cuenta que el tratamiento del huesped

con partículas de sílice, tóxico para los macrófagos, inhibe el fenómeno

En un trabajo reportado por Aye (6) al que nos hemos referido previamente, este investigador sugiere una actividad estimulante de los monocitos-macrófagos sobre el crecimiento de los precursores eritroides presentes en la médula ósea. Ello no puede considerarse discordante con los resultados que aportamos en esta tesis, puesto que la médula ósea contiene menos de un uno por ciento de monocitos-macrófagos, concentración no inhibitoria de la BFU-E circulante. En nuestras experiencias, no se pudo demostrar incremento de formación de colonias a concentraciones monocitarias bajas (inferiores a un uno por ciento), ó en el cultivo de células mononucleares no-adherentes a eficiencia sub-óptima en cuanto a concentración (0.5×10^5 células/cultivo). De otra parte, no es en absoluto segura la identidad exacta entre la BFU-E circulante y la BFU-E de la médula ósea, habida cuenta la existencia de evidencias a favor de una supuesta heterogeneidad celular dentro del término único BFU-E (44). Del mismo modo, se puede especular sobre una posible célula supresora necesaria para el efecto de los monocitos, asimilable a un linfocito T (T_{gamma}), quizá presente en la sangre periférica pero no en la médula ósea.

La segunda parte de nuestros resultados demuestra que la BFU-E presente en sangre periférica de humanos no presenta marcadores correspondientes a linfocitos T (rosetas espontáneas con hematíes de carnero) ni B (inmunoglobulinas de superficie), correspondiendo por tanto a una sub-fracción de la llamada población "null". En este aspecto, nuestros resultados son concordantes con los de Nathan (97). Sin embargo, en nuestros experimentos, los precursores no requirieron de la presencia de linfocitos T para mostrar proliferación y diferenciación óptima "in vitro". En este sentido, cultivos consistentes en suspensiones de linfocitos "null" (no-T, no-B), con una presencia de linfocitos T inferior al dos por ciento, dieron lugar a la producción de colonias eritroides con características de crecimiento (tamaño y grado de hemoglobinización) similares a las obtenidas con suspensiones de células linfocitarias sin fraccionar. La adición al cultivo de células "null" de linfocitos T no significó cambios en el tamaño ni madurez de las colonias eritroides. Nuestros resultados, por tanto, suponen de forma clara falta de evidencias del efecto T-helper preconizado por Nathan. Otros investigadores (124,133) coinciden en nuestras conclusiones en contra de un efecto T-helper necesario en la proliferación y maduración de colonias eritroides derivadas de BFU-E. Del mismo modo, en los linfocitos B no se pudo

demostrar ningún efecto modulador sobre el desarrollo de la BFU-E "in vitro", resultados en este caso no controversiales con ninguna experiencia previa por parte de otros investigadores

La disparidad existente entre nuestros resultados y los reportados por Nathan referentes a un efecto T-helper, no tiene una explicación definitivamente satisfactoria. De una parte, el efecto T-helper está reconocido de forma incuestionable en lo referente a la estimulación de síntesis de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B (126). También es conocido el hecho de que la anemia no caracteriza el cuadro clínico de pacientes afectados de inmunodeficiencia combinada severa ó de síndrome DiGeorge, carentes de linfocitos T maduros. En contraste con ello, la restitución a la normalidad de la anemia genéticamente determinada en ratones de la cepa W/W^V a través de infusión de médula ósea normal, es inhibida por la administración de suero anti-Thy1 2, fenómeno que puede hacerse de nuevo reversible por la administración concomitante de timocitos (144).

Atendiendo a nuestros resultados, el único efecto incuestionable de mecanismos de interacción celular en el crecimiento de BFU-E viene expresado por la actividad supresora que ejercen los monocitos. En la metodología seguida por Nathan, los pasos seguidos hacia la separación de poblaciones linfocitarias son

idénticos a los nuestros (21), salvo que en todos sus experimentos, el punto de partida es la suspensión mononuclear de la interfase de ficoll "entera", sin deplección monocitaria intencionada. Tampoco hace referencia a la práctica de incubación a 37°C de las células, previamente a su paso por la columna cromatográfica con anti-inmoglobulina humana. Este detalle técnico está preconizado por Lobo y cols (73) a efectos de liberar las inmunoglobulinas fijadas a receptores Fc de las células, ya que de otra forma, células no-B con éstos receptores podrían ser susceptibles de quedar fijadas a la columna, quitando sensibilidad a la técnica. Las dos circunstancias técnicas citadas pueden comportar variaciones sustanciales referentes a la proporción de monocitos presentes en cada una de las suspensiones celulares resultantes, B, T y "null". La práctica de la misma metodología en nuestro laboratorio, con evaluación del contenido monocitario en cada caso mostró

- 1º Linfocitos B alta contaminación monocitaria (presuntamente por un efecto mixto, derivado de una parte de mayor presencia de monocitos por la no incubación previa, en segundo lugar por un falso comportamiento B de muchos de estos monocitos, con receptores Fc en su superficie. Por

último, por el comportamiento ad
herente a la columna de los monoci
tos, cualidad intrínseca a su
propia naturaleza)

2º Linfocitos T Practicamente nula contaminación
monocitaria, habida cuenta que -
los monocitos no forman rosetas
espontáneas y por tanto no precipi
tarán en el gradiente de ficoll

3º Linfocitos "null" Alta contaminación monocitaria,
por acumular la práctica totali-
dad de monocitos correspondientes
a la fracción celular previa a la
deplección T, y de la que representan
tan tan sólo una octava parte aprox
ximadamente

La presencia de monocitos en la fracción "null"
de esta metodología es suficientemente importante co-
mo para condicionar una supresión practicamente abso-
luta del crecimiento eritroide La adición de células
B, asimismo con contaminación importante de monocitos,
no supondrá una dilución en el porcentaje de éstos
suficientemente importantes para permitir el crecimiento
de colonias eritroides Al contrario, concentraciones
altas de linfocitos T, carentes de monocitos, se-

rán suficientes para condicionar esta dilución y por tanto, darán lugar al crecimiento de la fracción "null" Según esta hipótesis, el preconizado efecto helper de los linfocitos T sobre la BFU-E podría explicarse por un fenómeno de simple supresión monocitaria en la fracción "null", con posterior desaparición del fenómeno secundariamente a dilución de los monocitos en el medio de cultivo y linfocitos T presentes Ptak y cols (108) y Stobo (126) han podido demostrar la existencia de influencias por parte de los monocitos sobre el efecto "helper" y "supresor" de los linfocitos T en la síntesis de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B, supuestamente a través de condicionar una mayor supervivencia de células "supresor" in vitro Esta hipótesis puede suponer una posible explicación coherente al fenómeno de supresión eritroide por parte de los monocitos, para el que no disponemos de otra explicación válida.

Ciertas observaciones clínicas y de laboratorio sugieren que la supresión monocitaria en la formación de colonias eritroides "in vitro" puede tener algún significado "in vivo" El tratamiento de ratones ó ratas infectados mediante agentes activadores de la eritropoyesis y de macrófagos, tiene capacidad para suprimir la eritropoyesis al tiempo que mejora la mielopoyesis (48,140). Por ello, un incremento así como una

actividad de los monocitos en la médula ósea supondrá un aumento "in situ" de la mielopoiesis a través de un aumento en la producción de CSF, lo que reduciría concomitantemente la proliferación de BFU-E y con ella la producción eritrocitaria. En este aspecto, anemias asociadas a inflamación crónica o neoplasias humanas pueden hallar explicación fisiopatológica a través del aumento en la proliferación y actividad de los monocitos en estos estados (19,87), etc. Asimismo, McGlave y cols (83) reportaron la detección de síndrome anémico asociado a histoplasmosis y evidencias de escaso crecimiento eritroide de la médula ósea "in vitro" por supresión macrofágica, todo ello reversible tras la resolución del proceso micótico de base.

7 RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los conocimientos actuales sobre la fisiología de la hemopoyesis permiten diferenciar dos componentes esenciales en su desarrollo

- I) El sustrato celular, correspondiente a las llamadas "stem cells"
- II) Los denominados "mecanismos de inducción y regulación", grupo heterogéneo de determinantes que modulan el crecimiento de aquellas

Clásicamente, las "stem cells" se subdividen en dos compartimientos el "pluripotente", correspondiente a una fase del proceso en que no existe un compromiso madurativo específico, y el "unipotente" o "comprometido" a una maduración específica dentro de una línea de diferenciación establecida

El primer compartimiento "unipotente" reconocido como tal fué el eritroide, que actualmente es accesible al estudio de modo muy fructífero mediante el uso de técnicas de cultivo "in vitro" Tales métodos han permitido reconocer la existencia de dos precursores eritropoyéticos sucesivos, bien diferenciados entre sí

- BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid), precursor precoz del compartimiento, probable inmediato posterior a la "stem cell" pluripotente

7 R E S U M E N Y
 C O N C L U S I O N E S
=====

- CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid), precursor tardío, antecesor cercano a las etapas morfológicamente reconocibles de la serie

Ambos precursores ofrecen, entre otras características diferenciales, una calidad y cronología distintas en su crecimiento "in vitro", a la vez que una distinta densidad celular, que permite separarlos por procedimientos físicos tales como la sedimentación en gradientes de albúmina. En el humano adulto, la BFU-E se ubica tanto en la médula ósea como en la sangre periférica, mientras que la CFU-E limita su presencia al primer emplazamiento. Por último, a través de modelos experimentales "in vivo" e "in vitro", se ha demostrado que mientras la CFU-E se halla bajo el efecto regulador directo de la eritropoyetina, la BFU-E no depende de ella. Los mecanismos que intervienen en la regulación del crecimiento de la BFU-E no están en absoluto aclarados, constituyendo un interesante campo de discusión. De ahí el interés de trabajos de investigación como el que constituye esta tesis.

O B J E T I V O -

El objetivo de esta tesis doctoral estriba en estudiar, a través del cultivo del precursor eritropoyético BFU-E presente en la sangre periférica, algunos mecanismos de interacción celular que puedan influir en el crecimiento "in vitro" de los citados precursores, a saber

- 1) El posible efecto modulador de los monocitos sobre el crecimiento de BFU-E
- 2) La ubicación de la BFU-E dentro de las poblaciones celulares mononucleares de la sangre periférica
- 3) El efecto de los linfocitos T y B sobre el crecimiento de BFU-E, "in vitro"

M A T E R I A L Y M E T O D O S -

El material y métodos para la realización de esta tesis incluye

- 1) Sangre procedente de humanos adultos sanos
- 2) Desarrollo del cultivo de BFU-E en el denominado sistema de coágulo plasmático, en presencia de eritropoyetina
- 3) Técnicas de fraccionamiento de la sangre periférica para la obtención de distintos preparados de células mononucleadas, a saber

- a) Gradientes de ficoll-hypaque para fraccionamiento de linfocitos
 - b) Separación de la población celular adherente (monocitos) por incubación en placas de cultivo de material plástico
 - c) Deplección monocitaria por incubación de la suspensión celular con Fe-carbonilo y posterior gradiente de ficoll
 - d) Recuperación de la población celular adherente en condiciones de viabilidad mediante el uso de una solución de lidocaína tamponada
- 4) Método del bio-ensayo de eritropoyetina a través de la llamada técnica de ratones policitémicos ex-hipóxicos
 - 5) Técnicas de separación, en macro-método, de las poblaciones linfocitarias B (paso de las células a través de una columna cromatográfica de sephadex con una anti-inmunoglobulina humana fijada) y T (rosetas espontáneas a 4°C con hematíes de carnero)

R E S U L T A D O S -

- 1º Previa corroboración de la existencia de actividad eritroide formadora de colonias (BFU-E) en la fracción de células mononucleadas obtenida de sangre periférica de donantes sanos adultos, y partiendo de fracciones mononucleadas post-ficoll con concentraciones distintas en monocitos, obje

tivamos un efecto inhibitorio de los monocitos sobre el crecimiento de colonias eritroides derivadas de BFU-E La práctica de co-cultivos con monocitos autólogos en suspensiones enriquecidas, mostró que este efecto inhibitorio presentaba una correlación directa con la concentración de monocitos presentes en el cultivo, ó, lo que es lo mismo, que la actividad eritroide expresada en forma de número de colonias, era inversamente proporcional al número de monocitos presentes en el cultivo ($p < 0.001$)

- 2º En experimentos adicionales pudimos objetivar que la citada acción inhibitoria no es debida
- a) a un efecto dilucional de las BFU-E por la presencia de monocitos
 - b) a un efecto competitivo de los monocitos con respecto a la eritropoyetina
 - c) a un contacto directo de los monocitos con los precursores eritropoyéticos,
- sino que obedece probablemente a la presencia de un inhibidor humoral no prostaglandínico liberado por los monocitos
- 3º La deplección de linfocitos T en fracción mononuclear de sangre periférica post-ficoll (con o sin monocitos) demostró un incremento significativo en el número de colonias de BFU-E ($p < 0.05$)

Sin embargo, tal como se demostró con los cálculos pertinentes, tal aumento fué debido a la concentración de las BFU-E consecutiva a la deplección de los linfocitos T

4º Los experimentos realizados con los cultivos de las distintas sub-poblaciones linfocitarias ofrecieron los siguientes resultados

- a) Las fracciones correspondientes a los linfocitos B y T no mostraban capacidad de crecimiento de BFU-E
- b) En cambio, el cultivo de la fracción linfocitaria "null" daba lugar a un crecimiento de BFU-E más intenso que el cultivo de la fracción "original" ($p < 0.001$), en la que se hallan todas las subpoblaciones
- c) La recombinación de la fracción "null" con distintas proporciones de linfocitos B ó T ó ambos a la vez no modificó el crecimiento eritroide respecto al observado con la fracción "null" aislada

De todos nuestros experimentos, cabe sacar como más destacadas, las siguientes conclusiones

C O N C L U S I O N E S -

- 1º El cultivo "in vitro" de células mononucleadas de sangre periférica en presencia de eritropoyetina genera crecimiento de colonias eritroides correspondientes al precursor BFU-E ("Burst Forming Unit -Erythroid")
- 2º Los monocitos inhiben el crecimiento "in vitro" en proporción directa a su concentración en el cultivo
- 3º La inhibición del crecimiento de tales colonias eritropoyéticas por parte de los monocitos, no requiere del contacto directo de los citados monocitos con los precursores BFU-E
- 4º El precursor BFU-E de la sangre periférica no presenta marcadores correspondientes a los linfocitos T ni linfocitos B
- 5º El precursor BFU-E de la sangre periférica está contenido en la fracción de los linfocitos llamados "null"
- 6º En nuestra experiencia, ni los linfocitos T ni los linfocitos B ejercen efecto alguno sobre la cantidad y/o calidad del crecimiento eritroide generado por las BFU-E presentes en la sangre periférica

7º Los estudios de la hemopoyesis mediante cultivos "in vitro" constituyen un interesante campo del que se han deducido ya valiosas aportaciones en el terreno fisiopatológico y del que se vislumbran aplicaciones en el terreno de la hematología clínica

8 R E F E R E N C I A S
B I B L I O G R A F I C A S
=====

8 R E F E R E N C I A S
B I B L I O G R A F I C A S

- 1 ABRAMSON S, MILLER RG, PHILLIPS RA
The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems
J EXP MED 145 1567, 1977
- 2 ALLEN TD
Ultrastructural aspects of in vitro haemopoiesis
en Lord BI, Potten C, Cole D (eds) The Second Symposium of the British Society for Cell Biology on Stem Cells and Tissue Homeostasis"
CAMBRIDGE ENGLAND CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS
p 217, 1978
- 3 ALLEN TD, DEXTER TM
Cellular interrelationships during in vitro granulopoiesis
DIFFERENTIATION 6 191, 1976
- 4 ARMITAGE P
Statistical methods in medical research
BLACKWELL SC PUB OXFORD 1971
- 5 AXELRAD AA, McLEOD DL, SHREEVE MM, HEATH DS
Properties of cells that produce erythrocytic colonies in vitro
en Robinson WA (ed) "Hemopoiesis in culture"
DHEW PUBLICATION N° (NIH) 74-205
WASHINGTON DC p 226 1974
- 6 AYE MT
Erythroid colony formation in cultures of human marrow effect of leukocyte conditioned medium
J CELL PHYSIOL 91 69, 1977

- 7 BARR RD, WHANG-PENG J, PERRY S
Hemopoietic stem cells in human peripheral blood
SCIENCE 190 284, 1975
- 8 BECKER AJ, McCULLOCH EA, TILL JE
Cytological demonstration of the clonal nature of
spleen colonies derived from transplanted mouse
marrow cells
N A T U R E 197 452, 1963
- 9 BERNSTEIN S
Tissue transplantation as an analytic and
therapeutic tool in hereditary anemias
AM J SURG 119 448, 1970
- 10 BERNSTEIN S, RUSELL E, KEIGLEY G
Two hereditary mouse anemias ($Sl/S1^d$ and W/W^V)
deficient in response to erythropoietin
ANN NY ACAD SCI 149 475, 1968
- 11 BLEIBERG I, LIRON M, FELDMAN M,
Studies on the regulation of hematopoietic spleen
colonies
B L O O D 29 469, 1967
- 12 BOTNICK LE, HANNON EC, HELLMAN S
Limited proliferation of stem cells surviving
alkylating agents
N A T U R E 262 68, 1976
- 13 BOTNICK LE, HANNON EC, HELLMAN S
Multisystem stem cells failure after apparent
recovery from alkylating agents
CANCER RES 38 1942, 1978
- 14 BOYUM A
Isolation of mononuclear cells and granulocytes
from human blood
SCAND J CLIN LAB INVEST supp 97, 21 77, 1968

- 15 BRADLEY TR, METCALF D
The growth of mouse marrow cells in vitro
AUST J EXP BIOL MED SCI 44 287, 1966
- 16 BRUCE WR, McCULLOCH EA
The effect of erythropoietic stimulation on the
hematopoietic colony forming cells of mice
B L O O D 23 216, 1964
- 17 CAHILL RA, SHARKIS S, AHMED A y cols
Normal WBB6/F1 induced peritoneal exudative cells
(PEC) and its products can cure the macrocytic
anemia^S of W/W^v mice
B L O O D (suppl 1) 200, 1978 (abstract)
- 18 CAMISCOLI JF, WEINTRAUB AH, GORDON AS
Comparative assay of erithropoietin standards
ANN NY ACAD SCI 149 40, 1968
- 19 CHARNEY E, MILLER G
Reticulocytopenia in sickle cell disease
AM J DIS CHILDHOOD 107 450, 1964
- 20 CHEVERNICK PA, BOGGS DR
In vitro growth of granulocytic and mononuclear
cell colonies from blood of normal individuals
B L O O D 37 131, 1971
- 21 CHESS C, SCHLOSSMAN SF
Anti-immunoglobulin columns and the separation of
T, B and null cells en "In vitro methods of cell
mediated and tumor immunity"
BLOOM BR, DAVIS JR eds pp 255 NEW YORK,
ACADEMIC PRESS, 1976
- 22 CLARKE BJ, HOUSMAN D
Characterization of an erythroid precursor cell
of high proliferative capacity in normal human
peripheral blood
PROC NATL ACAD SCI USA 74 1105, 1977

- 23 CLARKE BJ, NATHAN DG, ALTER BO y col
Hemoglobin synthesis in human BFU-E and CFU-E
derived erythroid colonies
B L O O D 54 805, 1979
- 24 CORMACK D
Time-lapse characterization of erythrocytic colony-
forming cells in plasma cultures
EXP HEMATOL 4 319, 1976
- 25 COTES PM, BANGHAM DR
Bio-assay of erythropoietin in mice made
polycythemic by exposure to air at reduced pressure
N A T U R E 191 1065, 1961
- 26 CUDKOWICZ G, STIMPFLING JH
Deficient growth of C57BL marrow cells
transplanted in F1 hybrid mice Association with
histocompatibility-2 locus
INMUNOL 7 291, 1964
- 27 CURRY JL, TRENTIN JJ
Hemopoietic spleen colony studies I Growth and
differentiation
DEVELOP BIOL 15 395, 1967
28. CURRY JL, TRENTIN JJ, CHENG U
Hemopoietic spleen colony studies III
Hemopoietic nature of spleen colonies induced by
limph node or thymus cells, with or without
phytohemagglutinin
J INMUNOL 99 907, 1967
- 29 CURRY JL, TRENTIN JJ, WOLF N
Hemopoietic spleen colony studies II
Erythropoiesis
J EXP MED 125 703, 1967
- 30 DEXTER TM, ALLEN TD, LAJTHA LG
Conditions controlling the proliferation of
hemopoietic stem cells in vitro
J CELL PHYSIOL 91 335, 1977

- 31 DEXTER TM, ALLEN TD, LATHA LG y cols
In vitro analysis of self-renewal and commitment
of hematopoietic stem cells en "Differentiation
of normal and neoplastic hematopoietic cells"
(CLARKSON B, MARKS P, TILL JE eds) COLD SPRING
HARBOR, COLD SPRING HARBOR SYMPOSIUM, p 63, 1978
- 32 DEXTER TM, MOORE MAS, SHERIDAN APC
Maintenance of hemopoietic stem cells and
production of differentiated progeny in allogeneic
and semi-allogeneic bone marrow chimeras in vitro
J EXP MED 145 1612, 1977
- 33 DUKES PP, MEYTES D, MA A, y col
A urinary factor which stimulates erythroid burst
formation more effectively than erythropoietin en
"Hematopoietic cell differentiation"
(GOLDE DW, CLINE MJ, METCALF D, FOX CF eds)
ACADEMIC PRESS, NEW YORK, p 119, 1978
- 34 ERSLEV AJ
Humoral regulation of red blood cell production
B L O O D 8 349, 1953
- 35 FAUSER AA, MESSNER HA
Granuloerythropoietic colonies in human bone
marrow, peripheral blood and cord blood
B L O O D 52 1243, 1978
- 36 FELDMAN N, BLEIBERG I, LIRON M
Regulation of intrasplenic formation of erythroid
clones
ANN N Y ACAD SCI 129 864, 1966
- 37 FELDMAN M, YAFFE D, LIRON M, y col
Regulatory mechanisms controlling the stability
of cell differentiation
CANCER RES 26 2041, 1966
- 38 FOWLER JH, WU AM, TILL JE y col
The cellular composition of hemopoietic spleen
colonies
J CELL PHYSIOL 69 65, 1967

- 39 FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHYAN RK, LATSINIK NU y
col
Stromal cells responsible for transferring the
microenvironment of the hematopoietic tissues
TRANSPLANTATION 17 331, 1974
- 40 GHIO R, LOWENBERG B, DICKE KA, y col
Effects of fibroblasts on the growth of erythroid
progenitor cells in vitro
EXP HEMATOL 5 341, 1977
- 41 GORDON LI, MILLER WJ, BRANDA RF, y col
Regulation of erythroid colony formation by bone
marrow macrophages
B L O O D 55 1047, 1980
- 42 GRAY JL, ROBINSON WA
In vitro colony formation by human bone marrow
cells after freezing
J LAB CLIN MED 81 317, 1973
- 43 GREGORY CJ, EAVES AC
Human marrow cells capable of erythropoietic
differentiation in vitro definition on three
erythroid colony responses
B L O O D 49 855, 1977
- 44 GREGORY CJ, EAVES AC
Three stages of erythropoietic progenitor cell
differentiation distinguished by a number of
physical and biologic properties
B L O O D 51 527, 1978
- 45 GRILLI G, CARBONELL F, FLIEDNER TM
Variations in erythroid and myeloid progenitor
cell numbers in normal human peripheral blood
BRIT J HAEMATOL 44 679, 1980
- 46 GUILBERT LJ, ISCOVE NN
Partial replacement of serum by selenite transferrin,
albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures
NATURE 263 594, 1976

- 47 HARA H, OGAWA M
Erythropoietic precursors in murine blood
EXP HEMATOL 5 161, 1977
- 48 HAURANI FI, MEYER A
Iron and the reticuloendothelial system
ADV EXP MED BIOL 73 171, 1976
- 49 HEATH DS, AXELRAD AA, McLEOD DL, y col
Separation of the erythropoietin-responsive
progenitors BFU-E and CFU-E in mouse bone marrow
by unit gravity sedimentation
B L O O D 47 777, 1976
- 50 HELLMAN S, BOTMICK LE, HANNON EC, y col
Proliferative capacity of murine hematopoietic
stem cells
PROC NATL ACAD SCI USA 75 490, 1978
- 51 HILLMAN RS, FINCH CA
Qualitative aspects of erythropoiesis en Red cell
manual
F A DAVIS Co , PHILADELPHIA p 1, 1974
52. HOFFMAN R, ZANJANI ED, LUTTON J, y col
Suppression of erythroid-colony formation by
lymphocytes from patients with aplastic anemia
N ENG J MED 296 10, 1977
- 53 HOFFMAN R, ZANJANI ED, VILA J, y col
Diamond-Blackfan syndrome lymphocyte-mediated
suppression of erythropoiesis
SCIENCE 193 899, 1976
54. HORLAND AA, WOLMAN SR, MURPHY Jr MJ, y col
Proliferation of erythroid colonies in semi-solid
agar
BR J HAEMATOL 36 495, 1977

- 55 HORWITZ DA, LOBO PT
Characterization of two populations of human lymphocytes bearing easily detectable surface immunoglobulin
J CLIN INVEST 56 1464, 1975
- 56 ISCOVE NN,
The role of erythropoietin in regulation of population size and cell cycling of early and late erythroid precursors in mouse bone marrow
CELL TISSUE KINET 10 323, 1977
- 57 ISCOVE NN
Erythropoietin-independent stimulation of early erythropoiesis in adult marrow cultures by conditioned media from lectin-stimulated mouse spleen cells en Hematopoietic cell differentiation (DW GOLDE, MJ CLINE, D METCALF y col eds)
NEW YORK ACADEMIC PRESS p 37, 1978
- 58 ISCOVE NN, GUILVERT LJ
Erythropoietin-independence of early erythropoiesis and a two regulator model of proliferative control in the hemopoietic system en In vitro aspects of erythropoiesis (MJ MURPHY Jr, ed) SPRINGER VERLAG NEW YORK p 3 1978
59. ISCOVE NN, SIEBER F, WINTERHALTER KH
Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A
J CELL PHYSIOL 83 309, 1974
- 60 JOHNSON GR, METCALF D
Pure and mixed erythroid colony formation in vitro stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin
PROC NATL ACAD SCI USA 74 3879, 1977

- 61 JURASKOVA V, TKADLECEK L
Character of primary and secondary colonies of
hematopoiesis in the spleen of irradiated mice
NATURE (London) 206 951, 1965
- 62 KAPLAN ME, CLARK C
An improved rosetting assay for detection of
human T lymphocytes
J INMUNOL METHODS 5 131, 1974
- 63 KNOSPE WH, BLOM J, CROSBY WH
Regeneration of locally irradiated bone marrow I
Dose-dependent long-term changes in the rat, with
particular emphasis upon vascular and stromal
reaction
B L O O D 28 398, 1966
- 64 KNOSPE WH, BLOM J, CROSBY WH
Regeneration of locally irradiated bone marrow II
Induction of regeneration in permanently aplastic
medullary cavities
B L O O D 31 400, 1968
- 65 KNOSPE WH, GREGORY SA, HUSSEINI SG, y col
Origin and recovery of colony-forming units in
locally curretted bone marrow of mice
B L O O D 39 331, 1972
- 66 LAJTHA LG
Bone marrow stem cell kinetics
SEMIN HEMATOL 4 293, 1967
- 67 LAJTHA LG, POZZI LV, SCHOFIELD R, y col
Kinetic properties of haemopoietic stem cells
CELL TISSUE KINET 2 39, 1969
- 68 LAJTHA LG, SUIT HD
Uptake of radioactive iron by nucleated red cells
in vitro
BRIT J HAEMATOL 1 55, 1955

- 69 LANGE RD, McDONALD TP, JORDAN T
Antisera to erythropoietin partial characterization
of two different antibodies
J LAB CLIN MED 73 78, 1969
- 70 LA PUSHIN RW, TRENTIN JJ
Identification of distinctive stromal elements in
erythroid and neutrophil granuloid spleen colonies
light and electron microscopic study
EXP HEMATOL 5 505, 1977
- 71 LEWIS JP, TROBAUGH FE Jr
The assay of the transplantation potential of
fresh and stored bone marrow by two in vivo systems
ANN N Y ACAD SCI 114 677, 1964
- 72 LEWIS JP, TROBAUGH FE Jr
Hematopoietic stem cells
NATURE (London) 204 589, 1964
- 73 LOBO PT, HORWITZ DA
An appraisal of Fc receptors on human peripheral
blood B and T lymphocytes
J IMMUNOL 117 939, 1976
- 74 LORD BI
Stem cells of renewing cell populations
(AB CAIRNIE, PK LALA, DG OSMOND, eds) ACADEMIC
PRESS, New York, p 165, 1976
- 75 LOTZOVA F, CUDKOWICZ G
Abrogation of resistance to bone marrow grafts by
silica particles Prevention of the silica effect
by the macrophage stabilizer poly-2-vinyl-pyridine-
n-oxide
J IMMUNOL 113 798, 1974
- 76 MATIOLI GT, VOGEL H, NIEWISCH H
The dilution factor of intravenously injected
hemopoietic stem cells
J CELL PHYSIOL 72 229, 1968

- 77 McCULLOCH EA
Control of hematopoiesis at the cellular level
in Regulation of hematopoiesis
(AS GORDON ed) APPLETON-CENTURY CROFTS, New
York, Vol I, p 136, 1970
- 78 McCULLOCH EA, SIMINOVITCH L, TILL JE
Spleen colony formation in anemic mice of
genotype W/W^V
SCIENCE 144 844, 1964
- 79 McCULLOCH EA, SIMINOVITCH L, TILL JE, y col
The cellular basis of the genetically determined
hemopoietic defect in anemic mice of genotype
Sl/S1^d
B L O O D 26 399, 1965
- 80 McCULLOCH EA, TILL JE
Repression of colony-forming ability of C57BL
hematopoietic cells transplanted into non-isologous
hosts
J CELL COMP PHYSIOL 61 301, 1963
- 81 McCULLOCH EA, TILL JE
Proliferation of hemopoietic colony forming cells
transplanted into irradiated mice
RADIAT RES 22 383, 1964
- 82 McCULLOCH EA, TILL JE
Regulatory mechanisms acting on hemopoietic stem
cells
AM J PATHOL 65 601, 1971
- 83 McGLAVE PB, ZANJANI ED, DAVIES S, y col
Suppression of erythropoiesis by bone marrow
macrophages in chronically infected (CI) patients
CLIN RES 27 301 A, 1979
- 84 McLEOD DL, SHREEVE MM, AXELRAD AA
Improved plasma culture system for production
of erythrocytic colonies in vitro quantitative
assay method for CFU-E
B L O O D 44 517, 1974

- 85 METCALF D, McDONALD HR, ODARTCHENKO N, y col
Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro
PROC NATL ACAD SCI USA 72 1744, 1975
- 86 METCALF D, MOORE MAS
Haemopoietic cells Their origin, migration and
differentiation
NEW YORK NORTH HOLLAND p 550, 1971
- 87 MEURET G, HOFFMAN G
Monocyte kinetic studies in normal and disease
states
BRIT J HAEMATOL 24 275, 1973
- 88 MEYTES D, MA A, ORTEGA JA, y col
Human erythroid burst-promoting activity produced
by phytohemagglutinin-stimulated, radioresistant
peripheral blood mononuclear cells
B L O O D 54 1050, 1979
89. MILLER JFA, BLOCK M, ROWLANDS PT, y col
Effect of thymectomy on hematopoietic organs of
the opossum embryo
PROC SOC EXP BIOL MED 118 916, 1965
- 90 MOFFAT DJ, ROSSE C, YOFFEY JM Jr
Identity of the hematopoietic stem cell
L A N C E T 2 547, 1967
- 91 MOORE MAS
Regulatory role of macrophages in hemopoiesis
J RET SOC 20(1) 89, 1976
- 92 MOORE MAS, BROXMEYER HE, SHERIDAN APC y col
Continuous human bone marrow culture I a antigen
characterization of probable pluripotential stem
cells
B L O O D 55 682, 1980

- 93 MOORE MAS, DEXTER TM
Stem cell regulation in continuous hematopoietic
cell culture
TRANSPLANT PROC 10 83, 1978
- 94 MOORE MAS, SHERIDAN APC
Pluripotential stem cell replication in continuous
human, prosimian and murine bone marrow culture
BLOOD CELLS 5 297, 1979
- 95 MOORE MAS, SHERIDAN APC, ALLEN TD, y col
Prolonged hematopoiesis in a primate bone marrow
culture system characteristics of stem cell pro-
duction and the hematopoietic microenvironment
B L O O D 54 775, 1979
- 96 MURPHY MJ Jr , URABE A
Modulatory effects of macrophages on erythropoiesis
en "In vitro aspects of erythropoiesis"
(MJ MURPHY ed) SPRINGER VERLAG, New York, p 189
1978
- 97 NATHAN DG, CHESS L, HILLMAN DG, y col
Human erythroid burst-forming unit T-cell
requirement for proliferation in vitro
J EXP MED 147 324, 1978
- 98 NISSEN C, ISCOVE NN, SPECK B
High burst-promoting activity (BPA) in serum of
patients with acquired aplastic anemia en "Experi
mental Hematology Today"
(Baum and Ledney, eds) SPRINGER VERLAG, New York
p 79, 1979
99. OGAWA M, PARMLEY RT, BANK HL, y col
Human marrow erythropoiesis in culture I
Characterization of methylcellulose colony assay
B L O O D 48 407, 1976

- 100 OGAWA M, MacEACHERN MD, AVILA L
Human marrow erythropoiesis in culture II
Heterogeneity in the morphology, time course
of colony formation and sedimentation velocities
of the colony forming cells
AM J HEMATOL 3 29, 1977
- 101 O'GRADY LF, LEWIS JP, TROBAUGH FE Jr
The effect of erythropoietin on differentiated
erythroid precursors
J LAB CLIN MED 71 693, 1968
- 102 OSSIAS AL, ZANJANI ED, ZALUSKY R, y col
Case report studies on the mechanism of
erythrocytosis associated with uterine fibromyoma
BRIT J HAEMATOL 25 179, 1973
- 103 PAPAYANNOPOULOU TH, BRICE M, STAMATOYANNOPOULOS G
Hemoglobin F synthesis in vitro Evidence for
control at the level of primitive erythroid stem
cells
PROC NATL ACAD SCI USA 74 2923, 1977
- 104 PAPAYANNOPOULOU TH, NAKAMOTO B, BUCKLEY J, y col
Erythroid progenitors circulating in the blood
of adult individuals produce fetal hemoglobin in
culture
SCIENCE 199 1349, 1978
- 105 PIKE BL, ROBINSON WA
Human bone marrow colony growth in agar-gel
J CELL PHYSIOL 76 77, 1970
- 106 PINKERTON PH, BANNERMAN RM
The hereditary anemias of mice
HEMAT REV 1 119, 1968
107. PRCHAL JF, ADAMSON JW, STEINMANN L, y col
Human erythroid colony formation in vitro evidence
for clonal origin
J CELL PHYSIOL 89 489, 1976

- 108 PTAK W, NAIDORF KF, GERSHOD PK
Interference with the transmission of T-cell
derived messages by macrophage membranes
J IMMUNOL 119 444, 1977
- 109 RAUCHWERGER JM, GALLAGHER MT, TRENTIN JJ
Role of the hemopoietic inductive microenvironments
(HIM) in xenogeneic bone marrow transplantation
TRANSPLANTATION 15 610, 1973
- 110 RICKARD KA, RENCRICCA NJ, SHADUCK RK, y col
Myeloid stem cell kinetics during erythropoietin
stress
BRIT J HAEMATOL 20 537, 1971
- 111 RINEHART JJ, GORMUS BJ, LANGE P, y col
A new method for isolation of human monocytes
J IMMUNOL METHODS 23 207, 1978
- 112 RUBINSTEIN AS, TROBAUGH FE Jr
Ultrastructure of presumptive hematopoietic stem
cells
B L O O D 42 61, 1973
- 113 SCHAEFER VW, DICKE KA, VAN BECKUM DW
Recovery of haemopoiesis in lethally irradiated
monkeys by frozen allogeneic bone marrow grafts
EUR J CLIN BIOL RES 17 483, 1972
114. SCHOFIELD R
A comparative study of the repopulating potential
of grafts from various haemopoietic sources CFU
repopulation
CELL TISSUE KINET 3 119, 1970
- 115 SCHOFIELD R, LAJTHA LG
Effects of isopropyl methane sulphonate (IMS) on
haemopoietic colony forming cells
BRIT J HAEMATOL 25 195, 1973

- 116 SCHOOLEY JC
The effect of erythropoietin on the growth and
development of spleen colony-forming cells
J CELL PHYSIOL 68 249, 1966
- 117 SCHOOLEY JC, GARCIA JF
Some properties of serum obtained from rabbits
immunized with human urinary erythropoietin
B L O O D 25 204, 1965
- 118 SENO S, MIYAHARA M, y col
Macrocytosis resulting from early denucleation
of erythroid precursors
B L O O D 24 582, 1964
- 119 SHARKIS SJ, SPIVAK J, STUART R, y col
Thymic control of hematopoiesis effect of
anti-theta serum + complement on proliferating
precursors (CFU-C and CFU-E) in normal and anemic
W/W^V mice
B L O O D 52(suppl 1) 215, 1978 (abstract)
- 120 SHARKIS SJ, WIKTOR-JEDREJCZAK W, AHMED A, y col
Anti-theta-sensitive regulatory cell (TSRC) and
hematopoiesis regulation of differentiation of
transplanted stem cells in W/W^V anemic and normal
mice
B L O O D 52 802, 1978
- 121 SIMINOVITCH L, McCULLOCH EA, TILL JE
The distribution of colony-forming cells among
spleen colonies
J CELL COMP PHYSIOL 62 327, 1963
- 122 SIMINOVITCH L, TILL JE, McCULLOCH EA
Decline in colony-forming ability of marrow cells
subjected to serial transplantation into irradiated
mice
J CELL COMP PHYSIOL 64 23, 1964

- 123 SOKAL RR, ROHLF FJ
Biometry
FREEMAN WH AND CO SAN FRANCISCO 1969
- 124 STEINBERG MH, COLEMAN MF, PENNEBAKER VB
Diamond-Blackfan syndrome evidence for T-cell
mediated suppression of erythroid development
and a serum blocking factor associated with
remission
BRIT J HAEMATOL 41 57, 1979
- 125 STEPHENSON JR, AXELRAD AA, McLEOD DL, y col
Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing
cells by erythropoietin in vitro
PROC NATL ACAD SCI USA 68 1542, 1971
- 126 STOBO JD
Immunosuppression in man suppression by
macrophages can be mediated by interactions with
regulatory T cells
J IMMUNOL 119 918, 1977
- 127 STOHLMAN F Jr, EBBE S, MORSE B, y col
Regulation of erythropoiesis XXI Kinetics of
red cell production
ANN N Y ACAD SCI 149 156, 1968
- 128 STORB R, GRAHAM TC, EPSTEIN RB y col
Demonstration of hemopoietic stem cells in the
peripheral blood of baboons by cross circulation
B L O O D 50 537, 1977
- 129 TEPPERMAN AD, CURTIS JE, McCULLOCH EA
Erythropoietic colonies in cultures of human
marrow
B L O O D 44 659, 1974
- 130 TESTA NG, DEXTER TM
Long term production of erythroid precursor cells
(BFU) in bone marrow culture
DIFFERENTIATION 9 193, 1977

- 131 TILL JE, McCULLOCH EA
A direct measurement of the radiation sensitivity
of normal mouse bone marrow cells
RADIAT RES 14 213, 1961
- 132 TILL JE, McCULLOCH EA, SIMINOVITCH LA
Stochastic model of stem cells proliferation,
based on the growth of spleen colony-forming
cells
PROC NATL ACAD SCI USA 51 29, 1964
- 133 TOROK-STORB BJ, SIEFF C, STORB R, y col
Immune-mediated aplastic anemia (AA) normal
erythroid burst formation in two patients after
T-cell depletion of peripheral blood cells
B L O O D 52(supp 1) 216, 1978 (abstract)
- 134 TRENTIN JJ
Influence of hemopoietic organ stroma (hemopoietic
inductive microenvironments) on stem cell
differentiation en "Regulation of hematopoiesis"
(Vol 1) (Gordon AS ed) NEW YORK Appleton-Century-
Crofts p 161, 1970
- 135 TRENTIN JJ
Hemopoietic microenvironments
TRANSP PROCEED 10 77, 1978
- 136 TRENTIN JJ, WOLF N, CHENG U y col
Antibody production by mice repopulated with
limited numbers of clones of lymphoid cell
precursors
J IMMUNOL 98 1326, 1967
- 137 UDUPA KB, REISSMANN KR
In vivo erythropoietin requirements of
regenerating erythroid progenitors (BFU-E, CFU-E)
in bone marrow mice
B L O O D 53 1164, 1979

- 138 UNANUE ER, BELLER DI, CALDERON J, y col
Regulation of immunity and inflammation by
mediators from macrophages
AM J PATH 85(2) 465, 1976
- 139 VAN BEKKUM DW, VAN NOORD MJ, MAAT B, y col
Attempts at identification of hematopoietic
stem cell in mouse
B L O O D 38 547, 1971
- 140 VAN FURTH R, DIESSELHOFF-DENDULK M, MATTLE H
Quantitative study on the production and
kinetics of mononuclear phagocytes during acute
inflammatory reaction
J EXP MED 138 1314, 1973
- 141 VOS O, DOLMANS JAS,
Self-renewal of colony forming units (CFU) in
serial bone marrow transplantation experiments
CELL TISSUE KINET 5 371, 1972
- 142 WAGEMAKER G
Cellular and soluble factors influencing the
differentiation of primitive erythroid progenitor
cells (BFU-E) in vitro en "In vitro aspects of
erythropoiesis"
(MJ MURPHY ED) NEW YORK SPRINGER-VERLAG, p 44,
1978
- 143 WELSHOUS WJ
Detection and use of cytological anomalies in
the mouse en "Mammalian cytogenetics and related
problems in radiobiology"
(C PAVAN, C CHAGAS, O FROTA-PESSOA y col eds)
OXFORD PERGAMON PRESS p 233, 1964
- 144 WIKTOR-JEDRZEJCZAK W, SHARKIS S, AHMED A, y col
Theta-sensitive cell and erythropoiesis identi-
fication of a defect in W/W^v anemic mice
SCIENCE 196 313, 1977

- 145 WILLIAMS N, JACKSON H, SHERIDAN APC y col
Regulation of megakaryopoiesis in long term bone
marrow cultures
B L O O D 51 245, 1978
- 146 WINCHESTER RJ, FU SM
Lymphocyte surface membrane immunoglobulin
SCAND J IMMUNOL 5(suppl 5) 77, 1976
- 147 WOLF NS, LAGUNOFF D
Autoregeneration of splenic structure and
function
Abstract of the International Society for
Experimental Hematology HOUSTON TEXAS p 29,1974
- 148 WOLF NS, TRENTIN JJ
Hemopoietic colony studies V Effect of
hemopoietic organ stroma on differentiation of
pluripotent stem cells
J EXP MED 127 205, 1968
- 149 WU AM, TILL JE, SIMINOVITCH L, y col
A cytological study of the capacity for
differentiation of normal hemopoietic colony-
forming cells
J CELL PHYSIOL 69 177, 1967
- 150 ZANJANI ED, McGLAVE PB, BHAKTHAVATHSALAN A, y col
Sheep fetal haematopoietic cells produce adult
haemoglobin when transplanted in the adult
animal
NATURE 280 495, 1979

