

REPUBLICA ARGENTINA
COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA



INFORME N.º 151

Tiempo de Duplicación de Células Esplénicas de
Ratón durante las Fases Latente y Logarítmica
de la Respuesta Primaria de Anticuerpo

por

Elmo E. Capalbo y T. Makinodan



BUENOS AIRES
1965



.....

**TIEMPO DE DUPLICACION DE CELULAS ESPLÉNICAS DE RATON
DURANTE LAS FASES LATENTE Y LOGARITMICA DE LA
RESPUESTA PRIMARIA DE ANTICUERPO ***

Elmo E. Capalbo y T. Makinodan #
Comisión Nacional de Energía Atómica

INTRODUCCION

Descubrimientos recientes (1-6) en la dinámica celular de la respuesta secundaria de anticuerpos indican que, durante las fases latente y logarítmica, células linfocíticas proliferativas no funcionales (PC) dan origen a células linfocíticas (P_1) proliferativas, funcionales que, a su vez, dan origen a células linfocíticas no-proliferativas, funcionales (P_2). También ha sido demostrado que los agentes físicos (7) y químicos (8-13) que pueden alterar la capacidad proliferativa y el metabolismo del ARN de células PC y P_1 suprimirán la aparición de células funcionales. Estos resultados apoyan claramente la idea de que la proliferación es esencial en la diferenciación suicida de las células linfocíticas implicadas en la respuesta secundaria del anticuerpo y recalcan que las células funcionales son todavía proliferativas inmediatamente después de su transformación.

Lamentablemente, no hay datos comparativos de esta naturaleza para una respuesta primaria de anticuerpos debido principalmente a la poca sensibilidad de los métodos para detectar cuantitativamente los sucesos celulares cambiantes asociados con la respuesta de anticuerpo. Por razones mencionadas en un artículo siguiente (14), parecería lógico que esta limitación puede ser superada cultivando las células en cámaras de difusión de 0.1μ de porosidad. Estudios sobre las fases latente tardía y logarítmica temprana de la respuesta primaria de anticuerpos fueron realizados entonces usando estas cámaras y células esplénicas de ratones dadores no pre-inmunizados. Se debería subrayar aquí que los bazo de ratones normales adultos, a diferencia de otros mamíferos de laboratorio, poseen, además de sus capacidades linfocíticas y plasmacitopoyéticas, la capacidad de producir granulocitos, eritrocitos y megacariocitos. Nuestros objetivos principales fueron determinar qué tipos celulares morfológicamente definidos estaban proliferando durante el período crítico siguiente a un estímulo antigénico y el tiempo de duplicación de distintas células pulso-marcadas con timidina tritiada (H^3T). Los resultados acá presentados apoyan y extienden nuestros descubrimientos preliminares (15).

* Trabajo realizado en la División de Biología del Laboratorio Nacional de Oak Ridge, Estados Unidos de Norteamérica.

Publicado en J. Immunology - Vol. 92; Nº 2 - 234-242 - Febrero 1964.

Jefe Radiation Immunology, Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, U.S.A.

MATERIAL Y METODOS

Animales.

Ratones C31F₁/Cum de doce semanas de edad, o sea, (C3H/Anf Cum ♀ x 101/Cum ♂), o ratones (C3H/Anf Cum ♀ x 101/Cum ♂)F₁, comunmente llamados ratones (C3H x 101)F₁, fueron usados como receptores o dadores. Los ratones receptores fueron separados en grupos de cinco a seis animales.

Condiciones de irradiación con rayos X.

Un equipo de rayos X Phillips de potencial constante y un Maxitron 300 General Electric se utilizaron como fuentes de rayos X. Las condiciones de irradiación con rayos X para la primera fueron las siguientes: 250 Kvp a 15 ma; exposición media en aire, 160 a 170 r/min; distancia objeto, 60 cm; filtración inherente, 1.0 mm de Al; filtración agregada, 1.0 mm de Al; y valor de hemireducción, 0.5 mm de Cu. Las condiciones para la segunda fueron: 300 Kvp a 20 ma; exposición media en aire, 170 a 190 r/min; distancia objeto, 70 cm; filtración inherente, 4.75 mm de Be; filtración agregada, 2 a 3 mm de Al; y valor de hemireducción, 0.4 a 0.5 mm Cu. Los ratones receptores fueron irradiados en un recipiente circular de Lucite perforado colocado en una plataforma giratoria, y se administró una única exposición total de 500 r.

Técnica de la cámara de difusión.

Los detalles de esta técnica han sido descritos anteriormente (14). Aproximadamente de 1 a 2 x 10⁷ células esplénicas dadoras suspendidas en solución estéril Tyrode y de 2 a 6 x 10⁶ glóbulos rojos de oveja fueron colocados dentro de cámaras de difusión de un compartimiento (0.1 μ porosidad). Las cámaras de control negativas contenían solamente células esplénicas. Las cámaras de difusión se implantaron intraperitonealmente (i.p.) en receptores irradiados dentro de las 3 horas después del tratamiento radiactivo.

Autorradiografía.

H³T de Schwarz Bio-Research, Inc., con una actividad específica de 1.9 ó 0.36 C/mmole y una concentración de 1 mc/ml, fué usada como marcador del núcleo celular (16, 17) para seguir la proliferación de células esplénicas durante el cultivo. Las células esplénicas fueron marcadas con H³T inyectando a los receptores portadores de cámaras de difusión conteniendo células esplénicas. Generalmente se administraron i.p. dos dosis de 5 ó 10 μc de H³T dentro de una hora. Las células esplénicas fueron sacadas una hora después de la última inyección y se preparó una suspensión celular. Se efectuaron autorradiografías con los extendidos de células de cámaras de cultivo recuperadas a intervalos distintos comenzando una hora después de la implantación. El método empleado fué el de Gude et al. (18) usando emulsiones Kodak Nuclear Track NTB, NTB-2 y NTB-3. Las autorradiografías fueron coloreadas con Giemsa.

Titulaciones de anticuerpos y recuentos diferenciales de células.

Se realizaron titulaciones de aglutinina en muestras de fluido de cámara de

cultivo (de 5 a 10 por día) empleando el método previamente descrito (19). Las titulaciones son expresadas como \log_2 de la recíproca de las más altas diluciones de muestras que dan apenas una aglutinación macroscópicamente visible. El conteo diferencial de células fué basado en la examinación de 1000 a 2000 células libres por intervalo de tiempo. Estas células fueron agrupadas de acuerdo con la hematología clásica y la nomenclatura sugerida por una comisión presidida por Fagraeus (20). Las células identificadas fueron las siguientes: células reticulares, células blásticas, células plasmáticas inmaduras (grandes) y maduras (pequeñas), linfocitos inmaduros (grandes, medianos) y maduros (pequeños), granulocitos inmaduros y maduros, normoblastos (poli-, baso-), histiocitos y fagocitos. El total de células libres nucleadas por cámara fué determinado según descripción anterior (14). El número de células de un tipo específico por cámara fué estimado multiplicando el conteo diferencial de células por el total de células libres nucleadas por cámara. El número de células marcadas con H^3T por 1000 células nucleadas de cada tipo fué determinado a intervalos de más o menos 12 horas después de la marcación-pulso y el número de células específicas marcadas con H^3T por cámara fué estimado multiplicando esta frecuencia por el total de células libres nucleadas por cámara. El tiempo de duplicación promedio (T_2) fué estimado determinando el tiempo promedio requerido para el número de células marcadas con H^3T de un tipo específico por cámara para aumentar al doble después de la marcación-pulso. La frecuencia de mitosis fué basada en el examen de 1000 células por cámara y una o dos cámaras por intervalo de tiempo.

RESULTADOS

Como fuera demostrado previamente (14), el número de células nucleadas por cámara decreció precipitadamente durante las primeras 48 horas después de cultivo, en presencia o ausencia del antígeno. De esta manera, se recuperaron más o menos 2.3×10^6 células de las 12×10^6 originales (más o menos 20%) en el segundo día. Durante el período subsiguiente de 24 horas el número de células decreció aún más, a más o menos 1.5×10^6 . Después, desde el día 3 al día 10, la población de células permaneció relativamente constante. Esto significa que, si las células estaban proliferando, el promedio de crecimiento debe ser igual al promedio de mortalidad durante este período. Por lo tanto, se trató de calcular el tiempo de duplicación promedio de células nucleadas (T_2) durante las fases latente tardía y logarítmica temprana. Esto se realizó estimando el aumento en el número de células marcadas con H^3T por cámara dentro de las 36 horas de la inyección-pulso de H^3T . Según se muestra en la figura 1, el T_2 de las células esplénicas en ausencia de estímulo antigénico es de 24 horas. De esta manera la vida media promedio ($T_{1/2}$) durante este período también puede estimarse en 24 horas. En contraste, el T_2 , y por consiguiente el $T_{1/2}$, de las células esplénicas es de más o menos 14 horas después del estímulo antigénico.

En un estado de equilibrio dinámico, una disminución del 60% en T_2 de la población total después del estímulo antigénico indica que las células estimuladas por el antígeno están proliferando preferencialmente con un T_2 característicamente corto. Por consiguiente, se realizaron estudios para estimar el número de células de tipos específicos por cámara durante los primeros 6 días después del cultivo.

Ya han sido presentados (14) los cambios celulares que ocurren durante los primeros 3 días, y acá pondremos énfasis en los cambios celulares que tengan lugar desde el día 3 hasta el día 6 (figura 2 y 3). En la ausencia de estímulo antigénico, el número de células retículo-blásticas permaneció relativa-

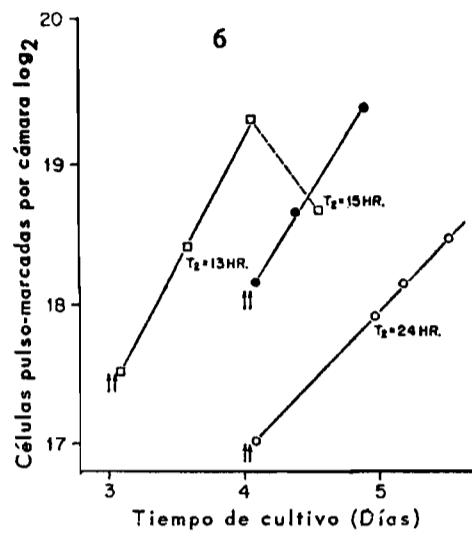


Figura 1. Estimación del tiempo de duplicación de células nucleadas pulso-marcadas. O, Control; □, Experimental; †, Tiempo de la inyección de H³T.

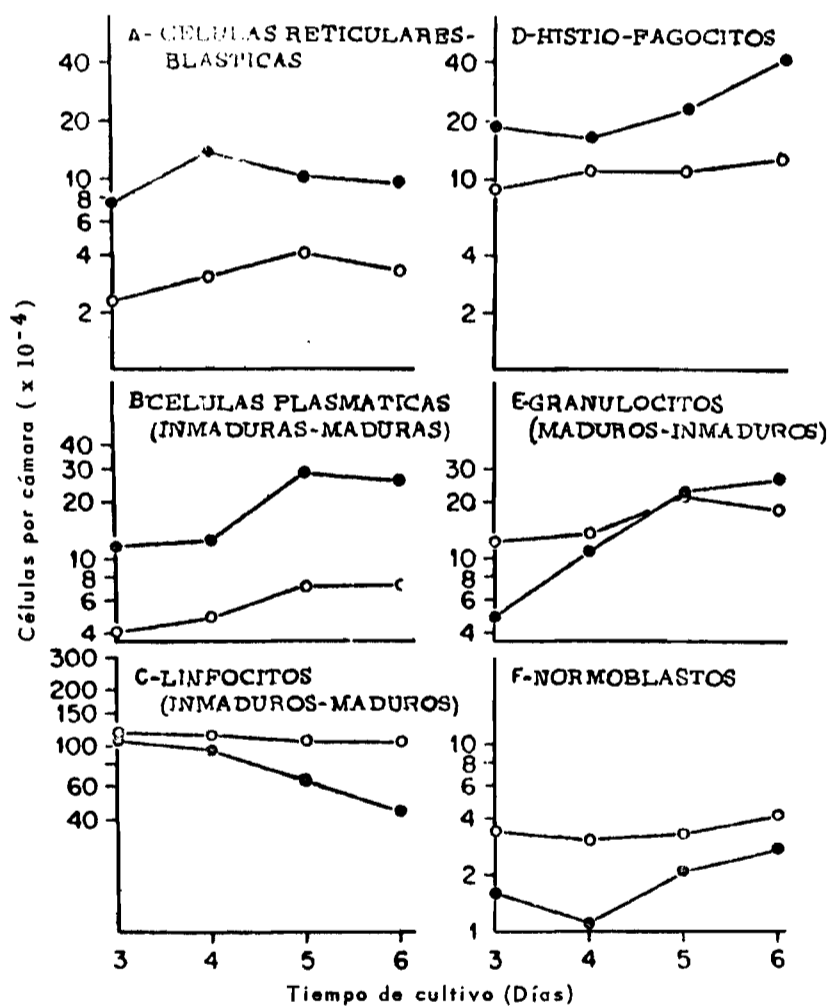


Figura 2. Cambio relativo en el número de células por cámara después de la estimulación antigénica. O, Control; ●, Experimental.

mente constante durante este periodo, y variando desde 2.3×10^4 a 4.1×10^4 . En contraste, después del estímulo antigénico estas células aumentaron de un mínimo de 5.0×10^4 en el día 2 a un máximo de 1.4×10^5 en el día 4 antes de disminuir ligeramente a 1.0×10^5 y 9.7×10^4 en los días 5 y 6 respectivamente. De esta manera, se produjo un aumento más o menos cuádruple en el día 4 en el número de células retículo-blásticas en el grupo experimental en relación con las del grupo control. El número de células plasmáticas inmaduras y maduras en ausencia de estímulo antigénico también permaneció relativamente constante, variando desde 3.0×10^4 a 7.0×10^4 . Después del estímulo antigénico estas células aumentaron de un mínimo de 6.5×10^4 en el día 2 a un máximo de 2.8×10^5 en el día 5 y 2.6×10^5 en el día 6. En el día 5 se produjo un aumento más o menos cuádruple en el número de estas células en el grupo experimental en relación con las del grupo control, similar al de las células retículo-blásticas en el día 4. El número de linfocitos inmaduros y maduros, en ausencia de estímulo antigénico, permaneció relativamente constante, variando desde 1.0×10^6 a 1.2×10^6 . Después del estímulo antigénico disminuyó gradualmente de 1.0×10^6 en el día 3 a 4.3×10^5 en el día 6. Una disminución de un poco más del doble fué registrada en el día 6 al comparar el grupo experimental con el grupo de control. El número de histiocitos y fagocitos en ausencia de estímulo antigénico permaneció relativamente constante, variando desde 8.9×10^4 a 1.3×10^5 . Después del estímulo antigénico el número aumentó ligeramente de 1.9×10^5 en el día 3 a 4.2×10^5 en el día 6. En el día 6 se produjo un aumento más o menos triple en el número de estas células en el grupo experimental en relación con las del grupo de control. No es de extrañar que haya un número relativamente mayor de histiocitos y fagocitos en la fase latente primaria y nuevamente en la fase logarítmica siguiendo la exposición de células esplénicas a partículas antigénicas. Durante la fase latente primaria la actividad fagocítica es alta debido a la presencia de partículas antigénicas y en la fase logarítmica debido a la pérdida principalmente de linfocitos. El número de granulocitos inmaduros y maduros en ausencia de estímulo antigénico, permaneció relativamente constante, variando desde 1.2×10^5 a 1.8×10^5 . Después del estímulo antigénico, estas células aumentaron de un mínimo de 3.9×10^4 en el día 2 a un máximo de 2.6×10^5 en el día 6. De esta manera podemos ver que el número de estas células disminuyó más o menos cuatro veces en 2 días después del estímulo antigénico antes de aumentar al valor de control en los días 5 y 6. Un ritmo de cambio comparable fué también observado con los normoblastos, aunque el número de muestras fué relativamente pequeño. Estos resultados muestran que durante las fases latente tardía y logarítmica después de la estimulación antigénica las células retículo-blásticas y plasmáticas están significativamente en aumento. Este aumento es asociado con la aparición de anticuerpo en el fluido de la cámara.

Más evidencia de la proliferación preferencial de células con un T_2 corto durante este periodo puede ser obtenida estimando el número de células mitóticas por cámara. Nuestros hallazgos están resumidos en la figura 4. El número de células mitóticas en ausencia de estímulo antigénico permaneció relativamente constante variando de 3.3×10^4 a 5.3×10^4 durante el periodo desde los días 2 a 6. La proporción de células mitóticas en el día y comparadas con el día 2 (índice A) fué de 1.6. Después de la estimulación antigénica el número de estas células aumentó de 7.0×10^4 en el día 2 a 2.1×10^5 en el día 6, con un índice A de 3.0. En vista del número pequeño de muestras, se calculó la proporción de la suma de células mitóticas de los días 2 a 6 entre los grupos experimental y de control (índice B). Esta razón fué de 3.04. Para determinar si la frecuencia mitótica es un reflejo de las células totales, las células retículo-blásticas- plas

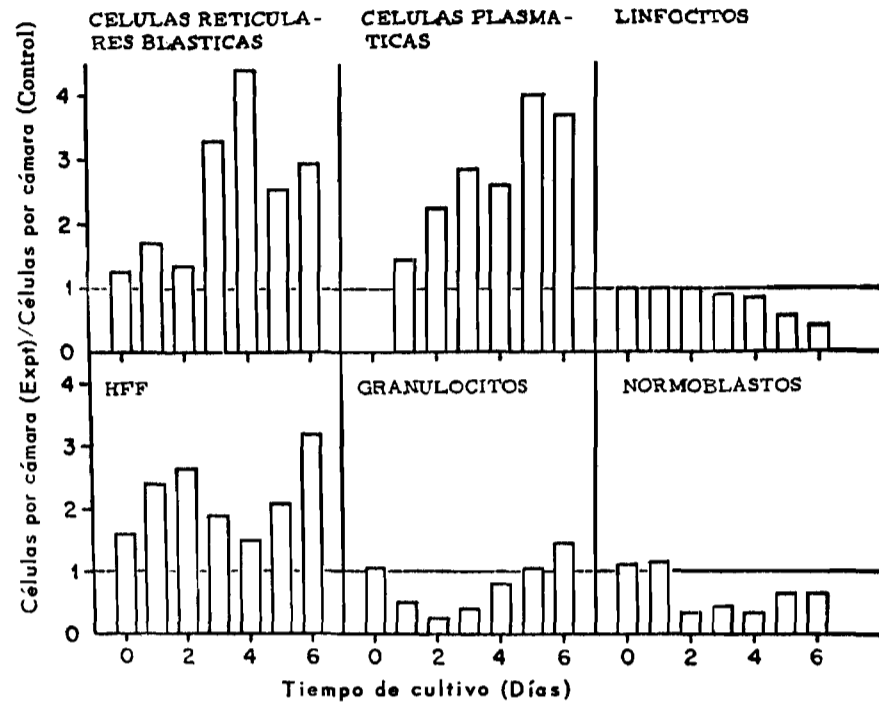


Figura 3. Cambio relativo en la proporción de tipos celulares entre los grupos control y experimental.

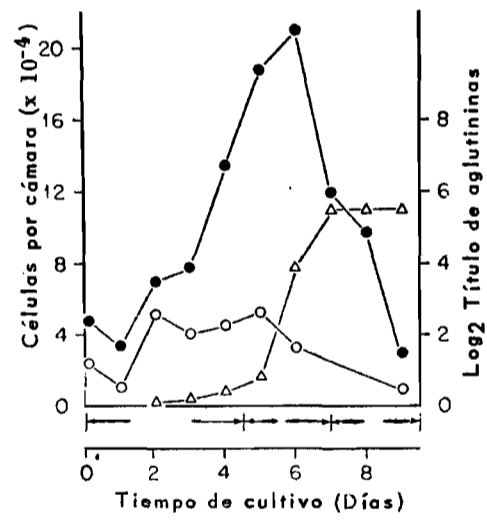


Figura 4. Aumento relativo en el número de células mitóticas por cámara durante las fases latente y logarítmica. O, Control; ●, Experimental; Δ, Título de anticuerpos.

máticas (RBP), o las células inmaduras noRBP, se emplearon similarmente los índices A y B. Los resultados (Tabla I) muestran que el cambio en la frecuencia de las células mitóticas después de estímulo antigénico es más un reflejo de las células RBP que de las células totales inmaduras o células inmaduras noRBP.

Estos resultados indican claramente que estamos tratando con un sistema en el cual las células están proliferando y se están diferenciando después de estímulo antigénico, en otras palabras, un sistema unidireccional de corriente anterógrada compuesto de series de compartimientos celulares. Esto significa que tenemos por lo menos dos variables con respecto a un compartimiento celular intermedio, las tasas de entrada y salida. Si asumimos que las células en tal compartimiento pueden tener un tiempo de generación variable (TG) debido a que el período de la síntesis de (S) DNA o período postmitótico (G1) puede variar, entonces nos encontramos con por lo menos tres variables. Para tener una mejor visión de este último problema, decidimos determinar si la razón, S:TG, de células que se dividen puede variar después de estímulo antigénico. En un sistema cerrado, como por ejemplo el de cámaras de difusión, pensamos que esta razón puede ser aproximada determinando la frecuencia de un tipo celular dado marcado dentro de la hora después de una pulso-inyección de H^3T . La marcación-pulso se llevó a cabo en los días 2, 4 y 6. La frecuencia de células pulso-marcadas entre las células retículo-blásticas, normoblastos, granulocitos inmaduros e histiocitos no fué alterada significativamente, por el estímulo antigénico, o sea que las frecuencias (marcadas/total) de los grupos experimental y de control entre estas células fué de 40/45 y 28/30, 10/16 y 11/15, 23/29 y 11/15 y 17/49 y 19/54, respectivamente, y la suma de las frecuencias de los grupos experimental y de control fué de 68/75 (91%), 21/31 (68%), 34/44 (77%) y 36/100 (36%), respectivamente. Analizando aún más se mostró que la diferencia en la frecuencia de normoblastos pulso-marcados y de granulocitos inmaduros no fué significativa, siendo la suma de 55/75 (73%). Por otra parte, la frecuencia de células pulso-marcadas en las células plasmáticas inmaduras y linfocitos inmaduros aumentó después de estímulo antigénico, o sea que, las frecuencias en los grupos experimentales y de control de estas células fueron de 15/20 (75%) y 15/31 (48%), y 10/24 (42%) y 14/56 (25%), respectivamente. Existen dos alternativas para explicar esta diferencia entre los grupos experimental y de control de las células plasmáticas inmaduras y de linfocitos inmaduros: o el período S es aumentado después del estímulo antigénico, con TG constante, o disminuye el TG después del estímulo antigénico con el período S constante. Actualmente no hay información disponible para resolver este problema. De todas maneras, estos resultados apoyan decididamente la idea de que hay por lo menos tres variables al tratar con un compartimiento intermedio celular en linfocito y plasmacitopoyesis, por ejemplo, tasa de entrada y salida y ciclo celular. Además, los resultados nos permiten estimar el número de células pulso-marcadas por cámara 1 hora después de la inyección de H^3T en los días 2, 4 y 6. Como se muestra en la figura 5, fué detectado un cambio de más del doble en comparación con los valores de control solamente entre los compartimientos de células retículo-blásticas y células plasmáticas inmaduras. El aumento mayor fué registrado en el día 4 en el primer grupo y en el día 6 en el segundo grupo.

Datos obtenidos sobre el T_2 de células totales por cámara, el número de células de diferentes tipos, el número de células mitóticas y el número de células pulso-marcadas una hora después de inyección de H^3T sugeriría que, al término de la fase latente y fase logarítmica temprana,

- a) la tasa de salida de células en el compartimiento *primario* es más rápida que en el grupo control;

TABLA I
Relación entre el número de células mitóticas por cámara y el número de células reticulares, blásticas y plasmáticas (RBP) por cámara

| Índices ^a | Tipos Celulares | | | |
|----------------------|-----------------|------|----------------|-----------------|
| | Mitótico | RBP | Total Inmaduro | No RBP Inmaduro |
| A Experimental | 3.0 | 3.1 | 0.5 | 0.3 |
| Control | 1.6 | 1.6 | 0.3 | 0.2 |
| B | 3.4 | 3.09 | 1.42 | 1.15.. |

$$A = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células por cámara en el día 6}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células por cámara en el día 2}}$$

$$B = \frac{\text{Células totales, experimental (suma de muestras desde el día 2 hasta el día 6)}}{\text{Células totales, control (suma de muestras desde el día 2 hasta el día 6)}}$$

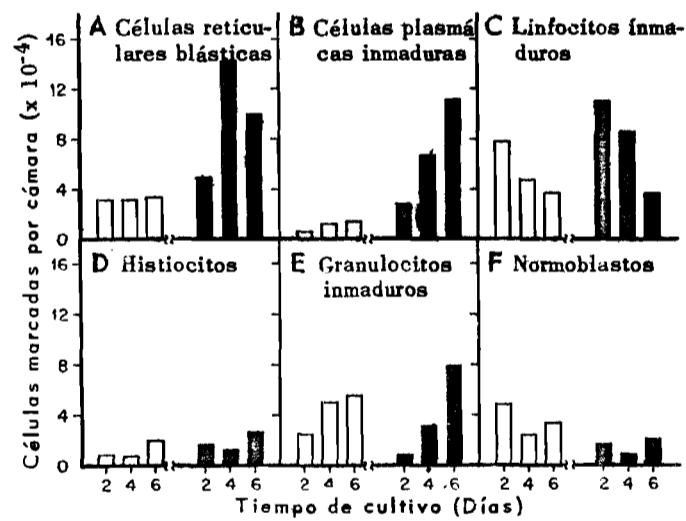


Figura 5. Células marcadas con H3T por cámara 1 hr. después de la inyección de H3T
 □ Control; ■, Experimental.

b) el T_2 de células plasmáticas y linfocitos es más corto en el grupo experimental que en el grupo control;

c) el T_2 de células *incompetentes* es aproximadamente el mismo.

Para probar esto, una sola inyección pulso de H^3T fué dada en el día 4 y la tasa de cambio en el número de células blásticas marcadas con H^3T , células plasmáticas, linfocitos e histiocitos-normoblastos-granulocitos por cámara fué estimado durante 30 horas después de la inyección. Los resultados se muestran en la figura 6. Las células blásticas pulso-marcadas disminuyeron con un $T_{1/2}$ de más o menos 12 horas después de la inyección de antígeno y más o menos 38 horas en la ausencia de estímulo antigénico. Las células plasmáticas pulso-marcadas y los linfocitos aumentaron con un T_2 de más o menos 7 horas después de la inyección del antígeno y más o menos 16 horas en la ausencia de estímulo antigénico. Histiocitos, normoblastos y granulocitos pulso-marcados aumentaron con un T_2 de más o menos 17 horas después de estímulo antigénico y más o menos 18 horas en ausencia del mismo. De esta manera estos resultados apoyan nuestra afirmación que las células blásticas que presumiblemente dan origen a varios tipos de células sanguíneas definidas están dejando su compartimiento muy rápidamente después del estímulo antigénico. El hecho de que el número de células blásticas no decreció en proporción durante este intervalo indica que la tasa de entrada en este compartimiento es también muy rápida. Además, es aparente que la mayoría de las células blásticas están entrando en el compartimiento de células plasmáticas-linfocitos. Debido a que el T_2 de las células incompetentes no es afectado por el estímulo antigénico en este momento, podemos además concluir que el T_2 de células totales nucleadas en la cámara es un reflejo del T_2 de las células plasmáticas y linfocitos y del $T_{1/2}$ de las células blásticas.

En vista de estos resultados, se hicieron cálculos del T_2 de las células linfoideas durante las fases latente y logarítmica cuando el número total de células por cámara permaneció relativamente constante. Como células linfoideas se consideraron los reticulocitos, células blásticas y células plasmáticas maduras e inmaduras y linfocitos. En este estudio, los cálculos del número de células linfoideas marcadas con H^3T por cámara fueron basados en el número de células linfoideas marcadas con H^3T por 1000 células linfoideas. Tal como se ve en la figura 7, el T_2 de las células linfoideas después de la inyección de antígeno decreció más o menos el doble durante este período desde más o menos 30 horas en ausencia de la inyección de antígeno a más o menos 14 horas después de la inyección del mismo.

DISCUSION

Los datos voluminosos acumulados durante los últimos 15 años sobre el mecanismo de la formación de anticuerpos indican claramente que los acontecimientos celulares que ocurren después del estímulo antigénico son característicos de un sistema de flujo unidireccional compuesto de una serie de compartimientos celulares. Recientemente propusimos un modelo en el cual existen en sucesión dos compartimientos celulares potencialmente competentes y cuatro compartimientos celulares competentes (21). En este modelo, el tamaño del compartimiento primario en cualquier momento dado es una función de la tasa de salida y del TG de las células, los compartimientos intermedios una función de las tasas de entrada y salida y del TG de las células, y el compartimiento terminal una función de la tasa de entrada y del $T_{1/2}$ de las células. Es evidente, entonces, que el T_2 de las células en cualquier compartimiento dado es una función de estas variables y no es necesariamente indicativo del TG. En vista de estas conside-

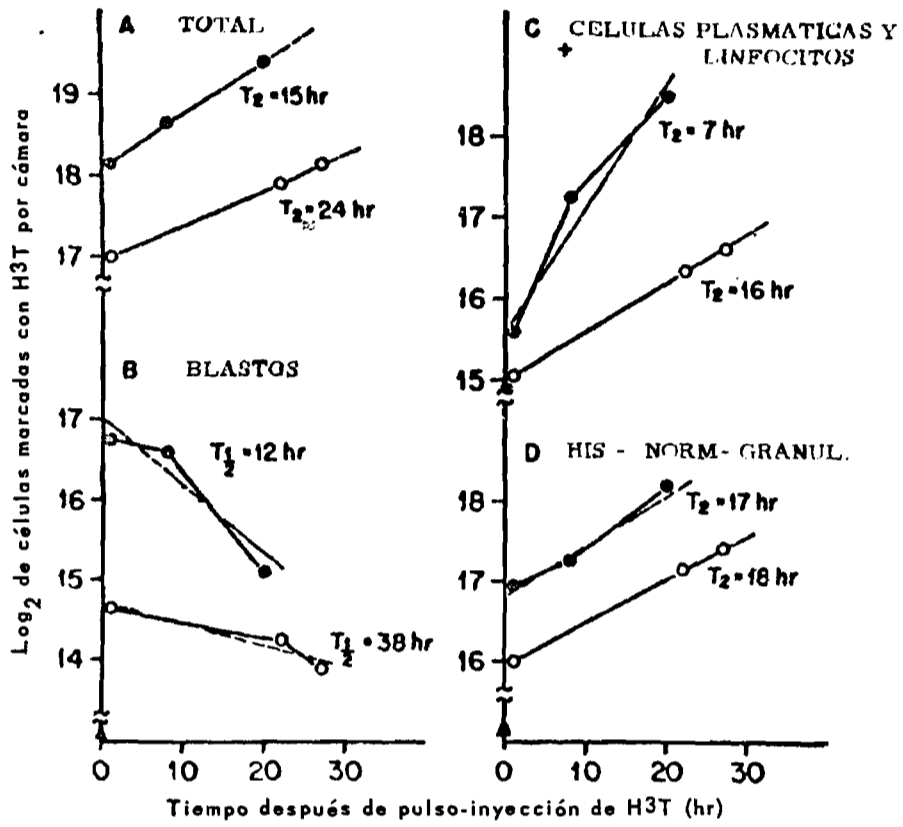


Figura 6. Estimación del T_2 y $T_{1/2}$ de las células, 4 días después del cultivo. O Control; ● Experimental; ↑, Tiempo de la inyección de H3T.

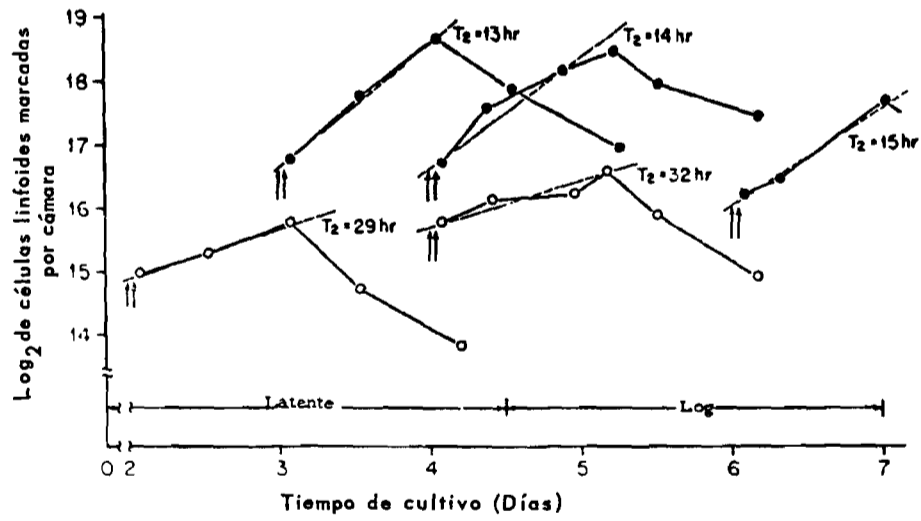


Figura 7. Estimación del T_2 de células linfoides durante las fases latente y logarítmica. O, Control; ●, Experimental; ↑↑, Inyección de H3T.

raciones, nosotros creemos que la información sobre la dinámica celular usando animales intactos podría estar sujeta a reservas, pues durante la etapa de proliferación de células linfoides después de una estimulación antigénica no existe necesariamente un estado de equilibrio dinámico con respecto a los órganos linfáticos y la circulación. Hemos usado el método de cultivo *in vivo* y sus modificaciones (22) durante los últimos años.

Los resultados aquí presentados demuestran que cuando las células esplénicas son cultivadas en cámaras de difusión con porosidad de $0.1\text{-}\mu$, existe un estado de equilibrio dinámico entre los días 3 y 10 sin tomar en cuenta si las células fueron o no estimuladas con un antígeno. La titulación para el anticuerpo en el fluido de la cámara mostró que la fase latente se extiende durante más o menos 4 días y la fase logarítmica por más o menos 3 días. En vista de estas observaciones y del hecho de que uno de los acontecimientos celulares más interesantes está ocurriendo durante la transición de la fase latente a logarítmica hemos limitado nuestros estudios en este informe a este período. Inicialmente encontramos que durante este período el T_2 de las células totales nucleadas, y por lo tanto el T_2 , es de más o menos 24 horas sin estímulo antigénico, pero después del estímulo antigénico disminuyeron significativamente a más o menos 14 horas. Posteriormente se obtuvieron pruebas que indicaban que esta disminución en T_2 de la población total después del estímulo antigénico es un reflejo de las células linfoides, o sea que el T_2 de las células linfoides es más o menos 14 horas después de estimulación antigénica. Sin embargo, en ausencia de la estimulación antigénica, el T_2 de las células linfoides fué de más o menos 30 horas en contraste con el de la población total, que es de más o menos 24 horas. Esta diferencia es debida al T_2 de células linfoides que se estimó en más o menos 18 horas. El T_2 de estas células no fué afectado por el antígeno.

Analizando aún más los datos encontramos que entre las células linfoides las células retículo-blásticas y las células plasmáticas eran principalmente responsables de este crecimiento selectivo durante este período después de la estimulación antigénica. Por ejemplo, la comparación del número de células por cámara con y sin estimulación antigénica demostró que un aumento máximo cuádruple en estas células fué registrado en los días 4 y 5, respectivamente. Tal relación mostró también estar directamente correlacionada con la del número de células mitóticas por cámara durante este período.

Cálculos preliminares de la relación S:TG, de células capaces de sintetizar ADN se hicieron determinando la frecuencia de células marcadas una hora después de una sola inyección de H^3T . Tal como se esperaba, no hemos detectado células plasmáticas maduras pulso-marcadas, ni linfocitos ni granulocitos. Entre las células inmaduras linfoides la frecuencia de células retículo-blásticas marcadas no fué afectada por el estímulo antigénico. De 75 de estas células, 68 fueron marcadas. El TG de células blásticas de rata ha sido estimado por Schooley (1) y confirmado por Nossal y Makela (2) y es de más o menos 12 horas. Si el TG de estas células fuera también de más o menos 12 horas, esto indicaría que el período S es de más o menos 11 horas. Así, si el período de mitosis (M) es de más o menos una hora, entonces el ciclo celular de estas células involucra solamente los períodos S y M, como es cierto en bacterias en el período de crecimiento. La frecuencia de linfocitos inmaduros pulso-marcados y de células plasmáticas aumentó significativamente después del estímulo antigénico. En ausencia del estímulo antigénico, 14 de 56 y 15 de 31, respectivamente, fueron marcados, pero después del estímulo antigénico 10 de 24 y 15 de 20, respectivamente, fueron marcados. Si este tamaño de muestra fuera adecuado, este resultado indicaría que el período S o el TG o ambos fueron afectados por el antígeno. En el último caso, el período G1 es acortado significativamente. En este respecto, Monesi (23)

ha informado que el período S de espermatogonia puede variar de 7 a 14.5 horas, dependiendo de los tipos y de la generación del tipo.

De acuerdo con el modelo de flujo unidireccional, tal como fuera recientemente elaborado por Lajtha et al. (24) para células de médula ósea, el tamaño del compartimiento primario después de un estímulo antigénico, disminuye, siendo esta disminución en parte una función de la dosis de antígeno. Los compartimientos subsiguientes deberían aumentar y disminuir sucesivamente. Para probar esto, se siguió la trayectoria de células pulso-marcadas a intervalos cortos durante más o menos un día durante la fase logarítmica latente de transición. Entre las células linfoides encontramos que el número de células blásticas disminuía con un $T_{1/2}$ de más o menos 12 horas después del estímulo antigénico y más o menos 38 horas en ausencia de éste. Aquí existe pues un ejemplo de células con un TG aparentemente muy corto cuyas células hijas están dejando su compartimiento con un ritmo muy rápido en este momento después de una estimulación antigénica, por ejemplo, tres de cada cuatro células blásticas están dejando el compartimiento entre los días 4 y 5. El tamaño del compartimiento durante este intervalo, sin embargo, ha decrecido solamente alrededor del 25%, indicando que por cada tres células que dejan el compartimiento hay dos células que están entrando en él. Debería ser recalcado acá que no consideramos que las células en el compartimiento primario deban ser necesariamente células blásticas. Es decir, pueden ser células reticulares. Nuestra evidencia, sin embargo, no apoya la idea de que linfocitos dediferenciados pueden funcionar como compartimiento primario. Nuestras muestras de la población total de células reticulares no fueron adecuadas pues, como se recalca en un artículo siguiente (14), nuestro método permite un muestreo adecuado solamente de células libres de los contenidos de las cámaras. Al mismo tiempo que la cantidad de células blásticas pulso-marcadas por cámara estaba disminuyendo, el número de células plasmáticas pulso-marcadas y linfocitos por cámara estaba aumentando con un $T_{1/2}$ de más o menos 7 horas después de estímulo antigénico y de más o menos 16 horas en ausencia de éste. Estos resultados, por lo tanto, concuerdan con el modelo de flujo unidireccional.

Finalmente, los datos presentados por Nossal y Makela (2) sobre las células blásticas no concuerdan con este modelo si asumimos que la reutilización de H^3T no es significativa. Ellos observaron que cuando a las ratas inmunizadas cuatro semanas antes se les aplicaba una única inyección de H^3T , 2 horas antes de una segunda inyección de antígeno, prácticamente todas las células blásticas fueron marcadas durante por lo menos 6 días. Se mostró que estas células tenían un TG de más o menos 12 horas y el ciclo celular no fué aparentemente interrumpido en distintos momentos después del estímulo antigénico como hemos encontrado nosotros. El número de células blásticas marcadas con H^3T por par de nódulos linfáticos aumentó más o menos 50 veces durante las primeras 72 horas y disminuyó más o menos un día el número de células marcadas con H^3T , aumentó aproximadamente 100 veces durante las primeras 96 horas y luego disminuyó más o menos 10 veces durante las 53 horas subsiguientes. Asumiendo que la reutilización de H^3T no es un factor significativo y que el ciclo celular no es interrumpido significativamente, 100% de la progenie de células pulso-marcadas con un TG de más o menos 12 horas pueden ser marcadas después de 6 días, siempre que estas células estén en un sistema cerrado y sean células nodiferenciadas. Si es así, por cada grano detectado por célula progenitora al fin de 6 días, debería haber 4×10^3 granos equivalentes por célula pulso-marcada inicialmente. La marcación en un cien por cien es también posible en un sistema diferenciado pero con la siguiente condición. Si estas células estaban en un compartimiento primario, entonces la tasa de salida durante por lo menos 3 días debe aproximarse a cero. Esto puede explicar el aumento de 50 veces en el número

de células marcadas con H^3T en este compartimiento. Si fuera así, las células plasmáticas no están en los compartimientos subsiguientes pues si no sus tasas de salida deberían también aproximarse a cero. Si estas células estuvieran en un compartimiento intermedio, las tasas de entrada y salida de este compartimiento deben aproximarse a cero. Por consiguiente, las tasas de entrada y salida de compartimientos intermedios subsiguientes deben también aproximarse a cero y por lo tanto no se debería detectar ningún aumento en el número de células terminales marcadas con H^3T durante por lo menos 3 días. En vista de estas consideraciones, la explicación más probable es que la reutilización es un factor importante en su método cuando sus recuentos de granos ajustados, por célula son de < 10 .

RESUMEN

El desarrollo celular fué seguido durante las fases latente y logarítmica de la respuesta primaria de anticuerpo por medio del cultivo de células esplénicas en cámaras de difusión de 0.1μ de porosidad.

Los resultados muestran que la disminución en el T_2 de las células totales y el aumento en el número de células mitóticas después del estímulo antigénico son principalmente reflejos de actividades proliferativas de células blásticas y plasmáticas. Cálculos estimativos de la relación, S: TG, indican que después de la estimulación antigénica fué detectado un aumento significativo solamente entre las células inmaduras plasmáticas y linfocitos. Esto indicaría que el período S es prolongado o que disminuyó el TG. También fué de interés el hecho de que la relación para las células retículo-blasticas era de 0.9 (68/75). Esto indicaría que el período G1 de estas células es muy corto. Estos resultados indican que uno se confronta con al menos tres variables al considerar un compartimiento celular intermedio de un proceso de diferenciación en una respuesta inmune, o sea el ciclo celular variable dependiente del estímulo y las tasas de salida y entrada. Tomando en consideración el tamaño del compartimiento celular, el T_2 , $T_2^{1/2}$ y S: TG de cada compartimiento celular, podemos concluir que las células terminales plasmáticas son el estado final de diferenciación de células retículo-blasticas, sugiriendo que si otras células somáticas únicas pueden dar origen a células plasmáticas terminales, lo deben hacer alimentándose en el compartimiento celular primario.

•

