

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Departamento de Bioquímica. — Madrid
(Director: Prof. A. Santos-Ruiz)

Estudios metabólicos con Cinc-65

V. - Alteraciones hematológicas producidas en sangre de perro por inoculaciones de este isótopo (*)

por

O. Puratic Solic, A. M. Galarza Basanta, C. García del Amo
y A. Santos-Ruiz

(Recibido para publicar el 3 de julio de 1963)

Desde que se observó por primera vez que los mamíferos expuestos a radiaciones ionizantes sufrían lesiones que les podían conducir a la muerte, se abrió un nuevo campo a la investigación biológica y son numerosos los trabajos realizados con animales expuestos a fuertes dosis de radiación externa (3), habiéndose estudiado desde sus efectos terapéuticos hasta graves lesiones de medula, tejidos linfáticos, y alteraciones de los elementos constituyentes de la sangre (7) proporcionales a las radiaciones recibidas.

Actualmente se trabaja sobre los efectos que pueden producir las radiaciones procedentes de isótopos artificiales que se encuentran en el interior de los organismos y que han llegado a ellos, bien con fines clínicos (8), de investigación (10) y (11), o por contaminaciones involuntarias (2).

Los efectos producidos por los isótopos parecen ser función de la especificidad del elemento para determinados órganos (9) es, por tanto, tema interesante en la bioquímica actual conocer estas localizaciones, su funcionalismo y los efectos específicos y generales que pueden producir dichas radiaciones.

Los peligros de contaminaciones por algunos isótopos tales

(*) Trabajo subvencionado por el Grant SG-SP-113 concedido por el «Agricultural Research Service» del United States Department of Agriculture.

como Cs-137, Sr-85, Sr-89, y Sr-90 (15), están muy estudiados, pues forman parte del *fallout* radiactivo. Importancia análoga pueden tener los efectos de las contaminaciones con Zn-65, ya que se origina juntamente con los elementos citados, que se forman en las explosiones y en otra serie de reacciones nucleares, tales como la acción de los neutrones sobre el Zn-64 estable (1) y los deuterones sobre el cobre de las armaduras de los ciclotrones (5).

Sin embargo, no se han estudiado los efectos que estas radiaciones pueden producir sobre los organismos.

Como se sabe, el cinc se encuentra en la mayoría de los órganos, ya que forma parte de enzimas importantes (19) y además parece ser específico de algunas funciones vitales, entre ellas la de la reproducción (6).

La vida media de 245 días es lo suficientemente larga para poder estudiar los efectos a largo plazo y las zonas de acumulación, así como su vida media biológica en los órganos más importantes.

En este trabajo presentamos un estudio sobre la repercusión que una administración pequeña y prolongada de Zn-65 pueda tener sobre los elementos de la sangre circulante.

Hemos elegido el perro como animal de experimentación porque su volumen sanguíneo nos permite realizar las pruebas durante largos períodos, sin que las extracciones realizadas influyan sobre los resultados.

Material y métodos

Se utilizaron perros de edad comprendida entre 6 meses y 5 años, los cuales, antes de comenzar las experiencias, fueron sometidos durante tres meses a las mismas condiciones de vida en que habían de permanecer después para su aclimatación.

Fueron inoculados por vía intraperitoneal con soluciones de Cl_2Zn-65 , isotónicas, apirógenas y estériles, en dosis que no provocaran efectos secundarios por hipercincismo. Las dosis administradas fueron:

- 1) *Dosis fraccionadas de 10 μ c/Kg/día.*
 - Dosis a:* Durante 10 días. Dosis total 100 μ c/kg.
 - Dosis b:* Durante 20 días. Dosis total 200 μ c/kg.
 - Dosis c:* Durante 35 días. Dosis total 350 μ c/kg.
 - Dosis d:* Durante 45 días. Dosis total 450 μ c/kg.

2) *Dosis única.**Dosis e:* 100 $\mu\text{c/Kg}$.

Las determinaciones de hematocrito, recuentos de eritrocitos y leucocitos, fórmula leucocitaria, retracción de coágulo, tiempos de sangría y coagulación y velocidad de sedimentación, se verificaron según las técnicas usuales. Los trombocitos se determinaron por el método directo de Feisal y Lüdin, modificado por M. y Mme. PIERRE (12). La fragilidad de los eritrocitos se determinó fotocolorimétricamente según el tanto por ciento de hemolisis producido en amortiguadores de fosfatos y CINA a pH 7,4 de concentraciones osmóticas equivalentes a soluciones de CINA desde 0,1 gr por ciento a 0,9 gr por ciento (4).

Durante el tiempo que duraron las experiencias se controló *in vivo* a modo de orientación la captación del Zn-65 por los órganos relacionados con la hematopoesis (13).

Resultados obtenidos

Los resultados obtenidos vienen dados en : Eritrocitos : Tabla I.

TABLA I

HEMATIES/mm ³				
	Dosis a	Dosis c	Dosis d	Dosis e
ANTES	7.590.000	6.950.000	6.570.000	6.500.000
1 hora	6.420.000	5.350.000	5.960.000	5.400.000
2 horas	6.630.000	6.050.000	6.240.000	5.900.000
3 horas	6.720.000	5.120.000	6.480.000	6.600.000
1 día	6.980.000	6.080.000	5.700.000	6.320.000
2 días	6.740.000	5.510.000	5.780.000	6.410.000
3 días	6.610.000	6.350.000	5.700.000	6.830.000
4 días	6.410.000	—	5.740.000	—
5 días	—	6.040.000	5.820.000	6.610.000
6 días	6.650.000	—	5.600.000	6.180.000
7 días	—	6.250.000	6.040.000	6.480.000
8 días	6.800.000	6.040.000	5.860.000	6.500.000
9 días	6.630.000	6.500.000	5.890.000	6.300.000
10 días	—	6.140.000	5.200.000	6.490.000
20 días	6.870.000	6.690.000	6.620.000	6.840.000
30 días	—	5.960.000	—	6.580.000
40 días	7.780.000	5.660.000	6.680.000	6.750.000
50 días	—	6.570.000	—	6.640.000
60 días	6.480.000	6.420.000	5.340.000	6.570.000
70 días	—	6.810.000	5.670.000	6.490.000
80 días	6.590.000	6.850.000	5.810.000	6.520.000
90 días	—	6.810.000	—	—
100 días	6.390.000	—	—	—

Resistencia osmótica de eritrocitos: Tablas II, III y IV.

TABLA II

(Dosis a)

RESISTENCIA OSMOTICA DE LOS HEMATIES					
% Hemolisis					
% ClNa	Antes	20 días	40 días	60 días	80 días
0,10	100	100	100	100	100
0,20	100	100	100	95,98	100
0,30	100	100	100	93,96	95,70
0,35	100	94,30	97,96	93,15	93
0,40	67	94,30	96,72	89,91	92,40
0,45	67	63,90	93,70	88,29	69,30
0,50	17	24,85	41,54	39,27	27,72
0,55	5	3,55	11,78	11,34	13,20
0,60	0	0	6,57	2,43	5,28
0,65	0	0	4,34	0,81	2,64
0,75	0	0	0	0	2,64

TABLA III

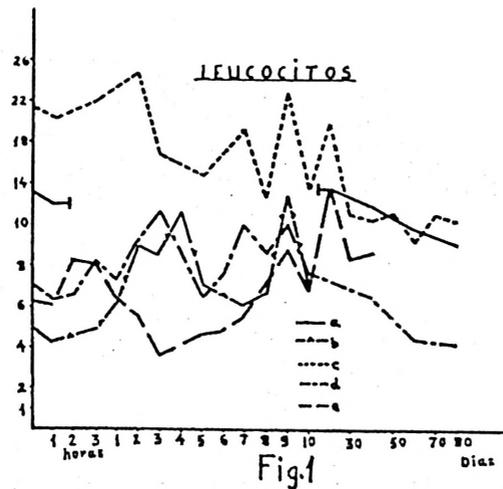
(Dosis b)

RESISTENCIA OSMOTICA DE LOS HEMATIES			
% Hemolisis			
% ClNa	Antes	20 días	40 días
0,10	100	100	100
0,20	100	100	100
0,30	100	100	100
0,35	100	100	100
0,40	100	82,50	98,90
0,45	75,90	79,60	86
0,50	29,04	42,90	-----
0,55	5,28	26,40	27,52
0,60	1,32	7,26	8,17
0,65	1,32	3,30	3,3
0,75	0	0	0,86

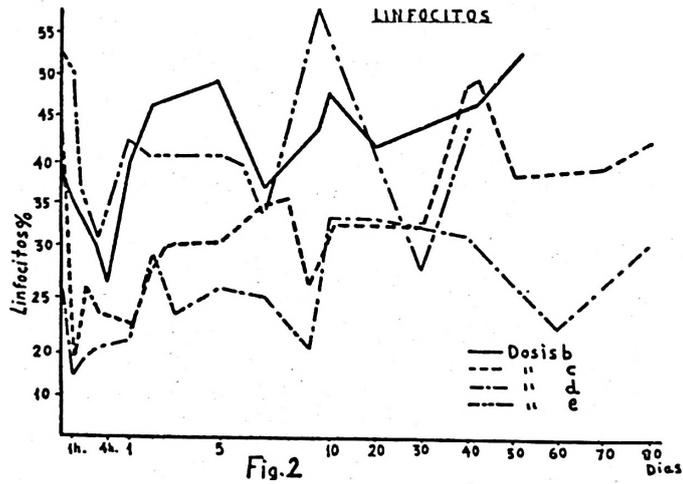
TABLA IV
(Dosis c)

RESISTENCIA OSMOTICA DE LOS HEMATIES				
% Hemolisis				
% CNa	Antes	20 días	40 días	60 días
0,10	100	100	100	100
0,20	100	100	100	100
0,30	100	98	100	100
0,35	100	—	100	100
0,40	100	87	100	100
0,45	76,23	85	95	85,5
0,50	24,31	71	68,40	40,5
0,55	15	42	19,95	35,15
0,60	0	9,20	6,75	11,40
0,65	0	6,10	0	4,75
0,75	0	0	0	3,80

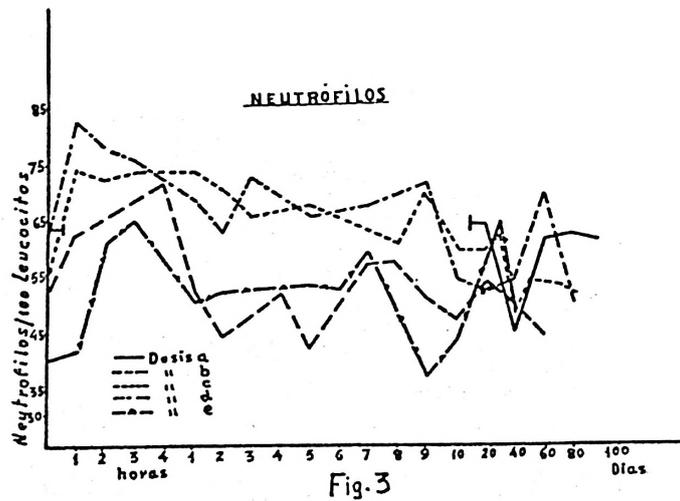
Leucocitos: Fig. 1.



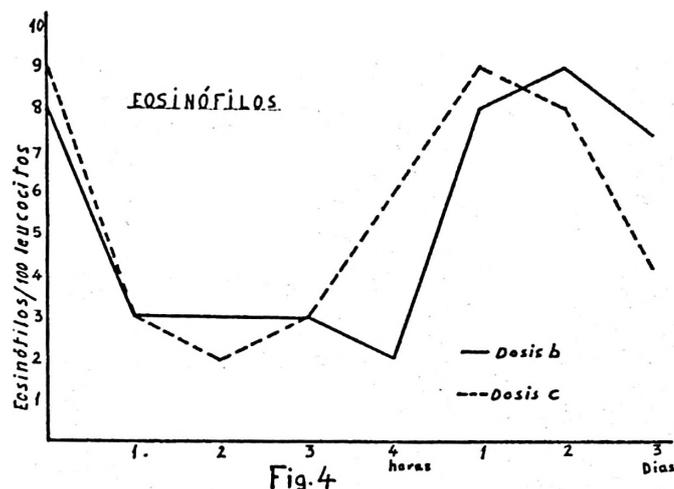
Linfocitos: Fig. 2.



Neutrófilos: Fig. 3.



Eosinófilos: Fig. 4.

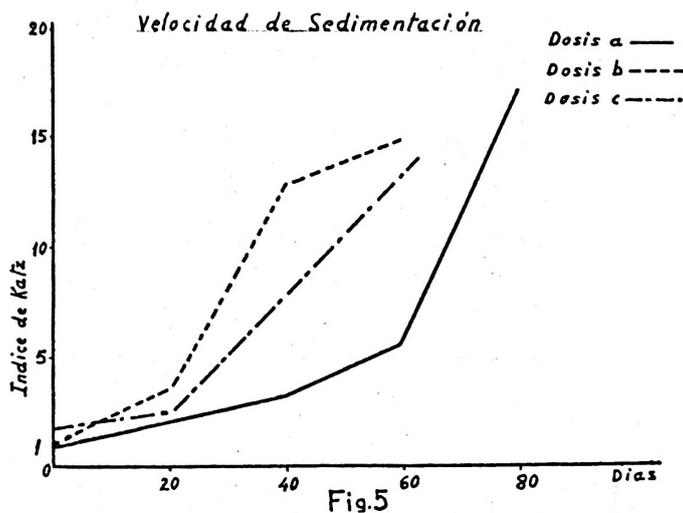


Monocitos: No sufren alteración.
 Basófilos: No sufren alteración.
 Trombocitos: Tabla V.

TABLA V

TROMBOCITOS/mm ³					
Dosis	a	b	c	d	e
ANTES	400.000	144.000	600.000	270.000	200.000
1 hora	_____	40.000	383.000	280.000	_____
2 horas	_____	40.000	435.000	190.000	_____
3 horas	_____	63.000	403.000	170.000	_____
1 día	_____	76.000	553.000	145.000	23.000
2 días	_____	100.000	_____	270.000	19.000
3 días	_____	100.000	498.000	280.000	_____
4 días	_____	242.000	_____	_____	_____
5 días	_____	136.000	270.000	233.000	13.300
6 días	_____	_____	_____	260.000	25.000
7 días	_____	40.000	218.000	180.000	43.000
8 días	_____	66.000	429.000	210.000	31.000
9 días	_____	73.000	522.000	_____	88.000
10 días	_____	100.000	490.000	286.000	40.000
20 días	419.000	163.000	400.000	248.000	_____
40 días	290.000	71.600	470.000	126.000	_____
60 días	111.600	_____	463.000	120.000	_____
80 días	76.000	_____	_____	38.000	_____

Retracción del coágulo: No sufre alteración. — Tiempo de sangría: No sufre alteración. — Tiempo de coagulación: No sufre alteración. — Velocidad de sedimentación: Fig. 5.



Discusión

A la primera hora de la inoculación del isótopo se observó una disminución de la cifra de los hematíes, que no parece depender de las dosis utilizadas por nosotros, ya que el descenso con dosis de $10 \mu\text{c}/\text{Kg}$. fue prácticamente semejante al producido con $100 \mu\text{c}/\text{Kg}$. (Tabla I.)

TARUSOV (18) encontró que el hígado de animales irradiados tiene poder hemolítico. Los animales de nuestra experiencia presentaban considerable radiación en las zonas hepática y esplénica, pulmones y corazón. Así, pues, la anemia precoz, más que por una inhibición de la eritropoiesis, consideramos que se debe a la acción directa de sustancias hemolíticas aparecidas después de la irradiación sobre células circulantes.

La recuperación fue más lenta en los animales que recibieron dosis fraccionadas. Dentro de ellos, alcanzó antes la normalidad un perro joven (dosis c, Tabla I), hecho que se explica por el mayor poder regenerador de su medula.

La recuperación es sólo aparente, ya que sobreviene después una anemia normocítica y normocrómica, posiblemente por depresión medular.

La resistencia osmótica de los hematíes disminuye después

de la inoculación, produciéndose hemolisis hasta en soluciones de ClNa al 0,75 % (Tablas II, III y IV).

Los leucocitos totales sanguíneos disminuyeron ligeramente durante las tres primeras horas después de la inoculación.

Siguió un período, durante el que se continuó administrando el isótopo, en el que se produjeron fluctuaciones, pasando de leucopenias a ligeras leucocitosis. Después se produjo una franca disminución de los leucocitos, llegando a valores cercanos al 50 % de los iniciales (Fig. 1). Existe poca probabilidad de que la discreta leucopenia inicial se deba a una lesión de los órganos leucopoiéticos, porque después de la primera depresión los leucocitos alcanzan valores superiores a los iniciales, aún cuando continúan las inoculaciones.

Pulmones, hígado y bazo, órganos leucocitolíticos, son los que presentan más radiación (13), pudiendo ésta estimular la formación de sustancias antileucocitarias a las cuales se debería el descenso de leucocitos en sangre. La depresión final puede deberse a una inhibición medular.

Consideraciones semejantes pueden aplicarse a la linfopoiesis, cuya variación sigue las mismas fases que la de los leucocitos totales (Fig. 2). Las dosis administradas no conducen a una exaltación en la producción de linfocitos. El Zn-65, que se encuentra en gran proporción en los troncos linfáticos mientras durante las inoculaciones, termina finalmente por producir una inhibición de la linfopoiesis.

La proporción de basófilos y monocitos no se altera.

Los eosinófilos sufren un pequeño descenso después de la inoculación (Fig. 4).

Los neutrófilos son las únicas células sanguíneas en las que hemos hallado un incremento después de la administración del isótopo. RIOPELLE (16) encontró que con fuertes dosis de irradiación externa se produce leucopenia por destrucción de la médula ósea. Las pequeñas dosis administradas durante nuestras experiencias conducen a una ligera neutrofilia, posiblemente por acción neurohormonal de tipo hipófiso-suprarrenal (Fig. 3).

Durante las primeras 24 horas después de la inoculación se produjo una trombocitopenia inicial, seguida de un estado fluctuante en el que se alcanzaron cifras hasta de 13.000 trombocitos/mm³ con una dosis única de 100 μ c/Kg. El descenso es más marcado con una dosis única que con dosis fraccionadas, y la recuperación más rápida. Al final se produjo un período de inhibición de la formación de trombocitos por la médula ósea. (Tabla V.) Sin embargo, los tiempos de sangría y coagulación y la retracción del coágulo se mantuvieron normales, por lo que, a pesar de la depresión de la formación de plaquetas, el número de

éstas está por encima del punto crítico de Frank y producen cantidad suficiente de retractozima.

La velocidad de sedimentación aumentó progresivamente después de la irradiación y a los 60 días, en que cesaron estas experiencias, el índice de Katz continuaba en aumento (Fig.5). Esta elevación coincidió con un estado de leucopenia, descenso del hematocrito y aumento de fibrinógeno y globulinas séricas (14). Por tanto, el aumento de la velocidad de sedimentación debe atribuirse más a una alteración de la concentración de proteínas séricas, que a un estado de infección o a alteraciones en los eritrocitos.

Resumen

Exponemos en este trabajo los resultados encontrados por nosotros cuando se inyectan dosis variables de Zn-65, en tiempos distintos, a perros que presentaban características normales al comenzar la experiencia en sus valores hematológicos.

Se han determinado las cifras de hematocrito, recuento de eritrocitos, leucocitos, fórmula leucocitaria, trombocitos, retracción de coágulo, velocidad de sedimentación, tiempo de sangría y coagulación.

Se han encontrado variaciones significativas en función del tiempo y de las dosis, para muchos de estos valores, permaneciendo otros constantes a lo largo de toda la experiencia. Se comentan estos resultados, que creemos son interesantes, para completar nuestros estudios sobre metabolismo del Zn-65 en los organismos vivos.

Summary

Metabolic studies with Zn-65. (V) Haematological alterations produced in the blood of dogs by inoculations of this isotope

The haematological variations found when variable doses of Zn-65 have been injected at different times in dogs which showed normal characteristics at the beginning of the experiment are studied.

The figures for haematocrit, erythrocyte and leucocyte counting, the leucocytary formula, thrombocytes, coagulum retraction, speed of sedimentation and bleeding and coagulation time, have been determined.

The red cells, thrombocytes and total leucocytes suffer a decrease, immediately after inoculation, which does not seem to depend on the employed dose. A fluctuating period ensues, ending in a final fall in all the cases studied up to the end of the 80 days which this experiment lasted.

The basophils and monocytes suffer no alteration. The neu-

trophils are the only blood-cells in which an increase has been found after the inoculation of the isotope. Bleeding and coagulation times and coagulum retraction remain unaltered. The globular resistance diminishes and haemolysis is produced even in 0.75 % ClNa. Erythrocyte sedimentation rate increases throughout the experiment.

Bibliografía

- (1) BALLOU, J. E. y THOMPSON, R. L. : *Health Physic.*, 6, 6-1961.
- (2) CONARD, R. A., ROBERTSON, J. S., MEYER, L. M., SUTOW, W. W., WOLINS, W., LOWREY, A., URSCHEL, H. C., BARTON, J. M., GOLDMAN, M., HECHTER, H., FICHER, M., CARVER, R. K., and POTTER, D. W. : *U. S. Atomic Energy Comm. Report. BNL-534, T- 135-1959.*
- (3) CORK, J. : *Radiation Research.*, 7, 551, 1957.
- (4) DACIE, J. V. : *The Haemolytic Anemias : Congenital and Acquired.* Ed. J. A. Churchill, London, 1954.
- (5) DILLA, V., M. A. and ENGELKE, M. J. : *Science*, 131-830-1960.
- (6) GUNN, S. A. y GOULD, T. C. : *Arch of Pathol.*, 75-21-1963.
- (7) LALTEVA, M. S. : *Med. Rad.*, 6, 78, 1961.
- (8) LAWRENCE, J. H. : *Proc. Internl. Conf. Peac. uses of Atom. Ener.* Ginebra, 1953 : VX-166-1956.
- (9) MILLER, E. R. : *Nuclear Sc. A. Abstr.*, 5, 134, 1951.
- (10) MIRAND, E. : *Radiation Research.*, 7, 462, 1957.
- (11) PETROVICH, I. K. : *Med. Radiol*, 6, n.º 7, 58, 1961.
- (12) PIETTE, M. y MME. : *Extrait du sang*, Tome XXX, 2, 148, 1959.
- (13) PURATIC, O., GALARZA, A., G.^a AMO, C., SANTOS RUIZ, A. : IV Trabajo de la Serie Estudios Metabólicos con Zn-65, *Rev. esp. Fisiol.* (En prensa.)
- (14) PURATIC, O., GALARZA, A., G.^a AMO, C., SANTOS RUIZ, A. : Trabajo VI de la Serie Estudios Metabólicos con Zn-65, *Rev. esp. Fisiol.* (En prensa.)
- (15) REDISKE, J. H. y HUNGATE, F. P. : *Proc. Internl. Conf. Peac. uses of Atom. Ener.* Ginebra, 1955 (V 13), 354, 1956.
- (16) RIOPELLE, ADES, H. W. y MORGAN, J. R. : *Radiation. Reser.*, 7, 581, 1957.
- (17) STOVER, B. I. y ATHERLON, D. R. : *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 99-201, 1958.
- (18) TARUSOV, B. N., citado por LEBEDINSKY, A. : Act. de la Conf. Inter. Sobre la utilización de la Energ. Atom. con fines pacíficos de Ginebra, vol. XI, 22, 1955.
- (19) VALLEE, B. L. : *Physiol. Rev.*, 39, 443, 1959.

