

## Inhibición de la eritropoyesis medular del ratón con plasma humano y de rata. Informe preliminar\*

J. A. Sánchez-Perovani \*\*, J. Callejas y A. O. Carmena \*\*\*

Instituto de Hematología e Inmunología. Departamento de Fisiología Hematológica. Hospital General Docente Enrique Cabrera. Altahabana. La Habana (Cuba)

(Recibido el 4 de septiembre de 1970)

J. A. SANCHEZ-PEROVANI, J. CALLEJAS and A. O. CARMENA. *Bone Marrow Erythropoiesis Inhibition with Human and Rat Plasma. Preliminary Report.* R. esp. Fisiol., 27, 35-38, 1971.

Human and rat, polycythemic and normal plasma were injected subcutaneously during ten consecutive days in normal Swiss mice. A significative decrease in the percentage of Bone Marrow erythroblast were obtained at the third day after the last plasma injection, without any change in Hematocrits, Hemoglobin, reticulocytes, Red Blood Cells counts and R.BC. Fe<sup>59</sup> incorporation. The marrow red cell depression continued after seven days, with a recovery at day ten.

The possibility of the presence of an inhibitory factor in normal human plasma and the role of the Spleen in mice erythropoiesis is discussed.

La homeostasis se consigue gracias a la interacción de mecanismos antagónicos, y ejemplo de esto lo tenemos en los sistemas de control hormonal y neuroendocrinos (8). Es por ello que la demostración de la existencia de una sustancia frenadora de la eritropoyesis, o inhibidora de la eritropoyetina, sería de gran ayuda para comprender la fisiopatología de la eritropoyesis.

En este trabajo se presentan los resultados preliminares realizados en un intento

por demostrar este factor frenador en humanos y animales.

### Material y métodos

1. PLASMA POLICITÉMICO. a) *Humanos*: Un paciente con esferocitosis hereditaria y otro con siclemia fueron transfundidos a razón de 10 ml de sangre entera por kilo de peso cada tres días, hasta elevar la hemoglobina por encima de 10 g %. Cuarenta y ocho horas después de la última transfusión se colectaron 50 ml de sangre con jeringuilla heparinada y se separaron los plasmas.

b) *Ratas*: Ratas Wistar IHC fueron sangradas por punción cardíaca bajo anestesia etérea con jeringuilla heparinada. Luego de tres lavados con solución fisioló-

\* Se agradece la valiosa colaboración de los técnicos ANDRÉS CRUZ y GONZALO FREYRE y de la doctora YOLANDA GARCÍA TRIANA.

\*\* Este trabajo es parte de la Tesis de Especialista de Primer Grado (Médico Hematólogo).

\*\*\* Investigador Visitante.

gica, la sangre fue concentrada a 70 % de hematocrito e inyectada intraperitonealmente a ratas Wistar IHC machos de 8-10 semanas de vida, durante dos días consecutivos en cantidades de 3 ml de sangre por 100 g de peso corporal. Estas ratas fueron sangradas a las 48 horas de la última transfusión y se separaron sus plasmas por centrifugación. Se descartaron las ratas con hematocritos menores de 55 %.

Tanto los plasmas humanos como los de rata fueron determinados por el método de KRZYMOWSKI *et al.* (10).

2. PLASMA NORMAL FRESCO. a) *Humanos*: Se obtuvo 50 ml de sangre de un voluntario normal y se separó su plasma.

b) *Ratas*: Ratas Wistar IHC adultas fueron sangradas y su plasma obtenido por centrifugación.

Ambos plasmas fueron desproteinizados según el método mencionado (10).

PLASMA HUMANO NORMAL LIOFILIZADO. Se tomó una mezcla de plasmas normales de distintos grupos en la proporción de 3/5 del grupo 0, 1/5 del grupo A y 1/5 del grupo B. Esta mezcla de plasmas fue liofilizada y usada luego de dos meses.

Todos los plasmas fueron inyectados en ratones Swiss hembras normales de peso entre 20 y 25 gramos (lotes de 5-7 animales) por inyección subcutánea durante 10 días consecutivos en dosis equivalentes a 0.4 ml y 1 ml, concentrados por liofilización parcial a volúmenes de 0.25 ml. Con el plasma humano normal liofilizado se hicieron además inyecciones equivalentes a 1 y 2 ml/día, concentrados a 0.25 ml. En el día 10 de la inyección de estos plasmas, los ratones fueron inyectados con 1  $\mu$ C de Fe<sup>59</sup> por vía intraperitoneal y los animales fueron sacrificados a las 72 horas de la inyección del Fe<sup>59</sup>.

Los grupos inyectados con dosis equivalentes a 1 y 2 ml de plasma humano normal liofilizado, fueron sacrificados a los 3, 7 y 10 días de la última inyección de plasmas.

Cada experimento corrió con un control de 5-7 animales inyectados con 0,25 ml de solución fisiológica, vía subcutánea, durante diez días consecutivos.

En todos los ratones se controló: hemoglobina, hematocrito, recuento de glóbulos rojos, reticulocitos, por ciento de eritroblastos en médula ósea e incorporación de Fe<sup>59</sup> al hematíe a las 72 horas de la inyección del radioisótopo.

## Resultados

En la tabla I se observa el efecto de los plasmas de pacientes con esferocitosis, siclemia (hipertransfundidos), plasma de voluntario normal y solución fisiológica. Se obtuvo con los tres tipos de plasma una disminución del por ciento de eritroblastos en médula ósea, estadísticamente significativo ( $P < 0,001$ ), cuando se comparan con los inyectados con solución fisiológica. Los parámetros periféricos y la incorporación de Fe<sup>59</sup> al glóbulo rojo no presentaron variaciones significativas. Los plasmas de ratas hechas policitémicas y de ratas nor-

Tabla I. Efecto de los distintos plasmas de un paciente con siclemia y otro con esferocitosis hereditaria hipertransfundidos y de plasma normal humano sobre la eritropoyesis del ratón.

Entre paréntesis, número de animales. Valores medios error standard.

	Eritroblastos %	Reticulocitos $\text{mm}^3 \times 10^5$	Incorporación Fe <sup>59</sup> al G.R. %
Plasma Siclemia «Policitémico» (5)	12,4 $\pm$ 0,9	1,05 $\pm$ 0,2	40,0 $\pm$ 5,2
Plasma Esferocitosis «Policitémico» (5)	12,4 $\pm$ 1,9	2,17 $\pm$ 0,3	41,2 $\pm$ 6,3
Plasma normal (5)	18,9 $\pm$ 1,1	1,66 $\pm$ 0,3	43,6 $\pm$ 4,4
Salina (7)	25,4 $\pm$ 2,3	1,37 $\pm$ 0,1	41,9 $\pm$ 2,0

Tabla II. Efecto del plasma de ratas normales y policitémicas sobre la eritropoyesis del ratón.

Se utilizaron 7 animales por cada grupo. Valores medios error standard.

	Eritro- blastos %	Reticu- locitos mm <sup>3</sup> × 10 <sup>5</sup>	Hct %	Hgb %
Plasma normal	14,7 ± 0,9	0,94 ± 0,3	41,4 ± 0,8	13,2 ± 0,2
Plasma policitémico	16,4 ± 1,2	1,05 ± 0,1	43,2 ± 1,0	14,0 ± 0,4
Salina	23,4 ± 1,8	1,25 ± 0,3	42,0 ± 0,8	13,6 ± 0,2

males produjeron también una disminución significativa ( $P < 0,001$ ) del por ciento de eritroblastos en médula ósea (tabla II) sin que tampoco variasen los valores hematológicos periféricos.

Los resultados obtenidos con 1 ml de plasma humano normal liofilizado pueden verse en la tabla III. El por ciento de eritroblastos de médula ósea permaneció bajo hasta el séptimo día de la última inyección de plasma, siendo ya normal al décimo día. Con 2 ml de plasma/día se encontraron valores similares.

En estos grupos tampoco encontramos variaciones significativas de la incorpora-

Tabla III. Respuesta de la médula ósea de ratones inyectados con plasma humano normal liofilizado, a los 3, 7 y 10 días de la última inyección.

Entre paréntesis, número de animales. ±: error standard.

Día	Eritroblas- tos totales %	Pro %	Bas %	Poli %
3 (7)	14,7 ± 0,9	0,9 ± 0,1	3,4 ± 0,3	10,4 ± 0,7
7 (5)	13,0 ± 1,1	0,9 ± 0,2	4,5 ± 0,4	7,6 ± 0,6
10 (5)	23,2 ± 2,6	1,4 ± 0,1	8,1 ± 1,1	13,7 ± 1,3
Salina (5)	23,7 ± 1,8	1,3 ± 0,3	8,4 ± 2,2	14,0 ± 1,2

ción de Fe59 al glóbulo rojo, ni de los hematocritos, hemoglobina, reticulocitos y recuento de glóbulos rojos.

## Discusión

Se ha publicado que animales llevados a policitemia por hipertransfusión presentan un factor plasmático capaz de inhibir la eritropoyesis en el ratón (9, 10, 14). También se ha citado la existencia de este factor en plasma humano de residentes permanentemente en altas alturas al ser descendidos al nivel del mar (11), aunque otros autores no han podido reproducir estos experimentos (2, 3). Con los plasmas «policitémicos» humano y de rata hemos obtenido una depresión significativa del por ciento de eritroblastos en la médula ósea del ratón, sin que variasen los valores hematológicos periféricos (hematocrito, hemoglobina, reticulocitos, recuento de glóbulos rojos e incorporación de Fe59 al glóbulo rojo).

Existen trabajos donde se postula que el plasma normal produce una ligera estimulación de la eritropoyesis (13), o no produce modificación alguna (3, 10). Sin embargo, se ha citado el hallazgo de cinco fracciones en el suero normal de banco, de las cuales una fracción suprime la maduración y producción de eritroblastos (12). Con plasma humano normal fresco o liofilizado, entero o desproteinizado, y con plasma fresco de rata normal, obtuvimos resultados similares a los hallados con plasmas «policitémicos», es decir, disminución del por ciento de eritroblastos medulares sin otro cambio hematológico. Cuando se siguió durante varios días el efecto del plasma humano normal liofilizado, el por ciento de eritroblastos medulares se mantuvo bajo aún después de siete días de la última inyección de plasma, y fue al décimo día cuando los valores de eritroblastos regresaron a la normalidad.

La eritropoyesis esplénica del ratón es de primordial importancia durante el embarazo (4,7), frente a endotoxinas bacte-

rianas (6), en respuesta a la alimentación después del ayuno (5), y la esplenectomía en este animal produce anemia y menor respuesta eritropoyética a la hipoxia (1). Si en el ratón normal la eritropoyesis esplénica tuviese un comportamiento distinto a la medular, como se ha visto frente a la recuperación del ayuno (5), podríamos explicar nuestros resultados en base a que el factor frenador presente en el plasma normal y policitémico inhibiría la eritropoyesis medular y no la esplénica, lo que impediría ver los resultados de esa inhibición (anemia) por hiperactividad compensatoria del bazo. Para tratar de verificar esta hipótesis, estamos realizando actualmente inyecciones de plasma normal humano en ratones y estudiando el metabolismo del hierro y la morfología del bazo frente a esa situación. Pensamos también reproducir los experimentos descritos en esta comunicación en ratones esplenectomizados.

### Resumen

Se inyectaron ratones hembras Swiss con plasma normal y policitémico humano y de ratón durante 10 días consecutivos por vía subcutánea. Se consiguió una disminución significativa del por ciento de eritroblastos de la médula ósea. Con plasma humano normal liofilizado, esta depresión eritroblástica medular persistió al séptimo día de la última inyección, con recuperación total al décimo día. No se obtuvie-

ron diferencias significativas con dosis equivalentes a 1 y 2 ml de plasma/día. La incorporación de Fe<sup>59</sup> al glóbulo rojo y el resto de los valores periféricos hematológicos no presentaron cambios significativos.

Se discute el papel del bazo en el mantenimiento de la eritropoyesis durante la depresión eritropoyética de la médula ósea.

### Bibliografía

1. AGGIO, M. C., y GARCÍA, N. E.: *R. esp. Fisiol.*, **25**, 329, 1969.
2. CARMENA, A. O., HOWARD, D., y STOHLMAN, F.: *Sangre*, **16**, 267, 1969.
3. ERSLEV, A. J., and THORLING, E. B.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **149**, 173, 1968.
4. FOWLER, J. W., and NASH, D. J.: *Develop. Biol.*, **18**, 331, 1968.
5. FRUHMANN, G. J.: *Zeitsch. Zellforsch.*, **75**, 258, 1966.
6. FRUHMANN, G. J.: *Blood*, **27**, 363, 1966.
7. FRUHMANN, G. J.: *Blood*, **31**, 242, 1968.
8. HARDY, J. D.: *Medical Physiology*, Mosby Co. St. Louis, 1968, p. 591.
9. KRZYMOWSKA, H.: *Acta Physiol. Polon.*, **17**, 1 1966.
10. KRZYMOWSKI, T., and KRZYMOWSKA, A.: *Blood*, **19**, 34, 1962.
11. REYNAFARJE, C.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **149**, 472, 1968.
12. STEINBERG, B., CHENG, F. H. F., and MARTIN, R. A.: *Acta Haemat.*, **33**, 279, 1965.
13. WHITCOMB, W. H., and MOORE, M. Z.: *J. Lab. Clin. Med.*, **66**, 641, 1965.
14. WHITCOMB, W. H., and MOORE, M. Z.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **149**, 462, 1968.