

Acción *in vivo* de la fitohemaglutinina sobre la eritropoyesis del ratón

J. L. Scaro, Raquel Alvarez-Prado de Tombolesi y M. A. Carrera

Instituto de Biología de la Altura
Universidad Nacional de Tucumán
San Salvador de Jujuy (Argentina)

(Recibido el 11 de noviembre de 1970)

J. L. SCARO, R. ALVAREZ-PRADO and M. A. CARRERA. *In vivo Action of Phytohemagglutinin on Mouse Erythropoiesis*. R. esp. Fisiol., 27, 115-124. 1971.

In the 48-72 hour period that follows phytohemagglutinin injection to fasted mice a series of changes in the spleen occur similar to those found in normal mice after phytohemagglutinin. In the same period the splenic erythropoietic response to erythropoietin stimulation becomes greatly increased. This increased response to erythropoietin is accompanied by a greater concentration of *Stem Cells* in the spleen. The possibility that the transformed lymphocytes may act as erythropoietic progenitors under the influence of EP is discussed.

La transformación blastoidea que experimenta la mayoría de los linfocitos cultivados en presencia de fitohemaglutinina (FHA) es precedida en algunos casos, y se acompaña en otros, de significativos cambios funcionales (2, 7, 8, 10, 12). Esta transformación que eventualmente conduce a la mitosis, se ha demostrado que es reversible (9). No existen evidencias, sin embargo, de que desde esta nueva condición los linfocitos puedan transformarse en elementos de otras líneas celulares.

La administración de FHA *in vivo* al ratón, sigue de un aumento de peso del bazo en el que coincidentemente aparecen elementos celulares con las características morfológicas de los elementos blastoides observados en las experiencias *in vitro* (5). Este cambio se acompaña de un aumento de los normoblastos y precursores granulocíticos que ha sido interpretado como una consecuencia del efecto estimulante inespecífico sobre las mitosis, producido

por la FHA sobre esos elementos. No puede descartarse, sin embargo, la posibilidad de que dichos aumentos sean debidos a la existencia en tales condiciones, de un mayor número de progenitores hemopoiéticos (*Stem cells*) en el área esplénica. Si tal hecho existiese podría ocurrir que los cambios inducidos por la FHA sobre los linfocitos esplénicos les confiriera la cualidad de dar como progenie elementos de las líneas eritroides y granulocíticas, es decir, adquieren la cualidad de Stem cell hemopoiética.

En el presente trabajo se comunican los resultados de estudios encaminados a aclarar esta alternativa estudiando: *a*) Cambios que produce la administración de FHA sobre la respuesta a la eritropoyetina, y *b*) Determinar si existe una correlación entre la acumulación de elementos blastosímiles que aparecen en el bazo después de la administración de FHA y la dimensión relativa de la población de

Stem cells en ese órgano, medida a través del potencial de trasplante y de la capacidad de repoblación hemopoiética endógena. El incremento de la actividad eritropoyética en el área esplénica producida por la FHA encuentra, en estos estudios, una explicación más en favor de un aumento de la población de *Stem cells* hemopoiéticas que de una mayor actividad proliferativa de los elementos normoblásticos.

Material y métodos

Respuesta a la inyección de eritropoyetina (EP). Ratones hembras de 7 a 9 semanas, en ayuno desde el día 0, se inyectan con 0,5 U de EP los días 2 y 3. El día 4 se determinó la tasa de actividad eritropoyética por la capacidad de incorporar Fe^{59} del bazo y la medula ósea, cuatro horas después de inyectar el radiohierro. La FHA se administró en forma intravenosa a varios tiempos con relación a la primera inyección de EP, a saber, 1, 2, 3 y 4 días. Unos grupos de animales recibieron solamente EP y otros solamente FHA. Otro grupo que fue sometido solamente al ayuno, sirvió de control. Para el cálculo de la incorporación de Fe^{59} al bazo y la medula ósea se procedió en la forma descrita en otro trabajo (4). De cada grupo se separaron algunos animales de cuyos bazos se procedió a efectuar cortes que se colorearon con May Grundwald-Giemsa. En los mismos se procedió a estudiar a distintos tiempos después de la administración de FHA, los cambios en la composición celular del bazo.

EFFECTOS DE LA FHA SOBRE LA CAPACIDAD DE REPOBLACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL BAZO Y DE LA MEDULA ÓSEA.

Preparación de los dadores de células y del inoculum. Ratones hembras fueron sometidos a ayuno total como se descri-

bió para el ensayo de eritropoyetina durante un período de 4 días al término del cual fueron utilizados para obtener células de la medula ósea y del bazo. Algunos animales fueron inyectados con FHA de manera que al término del período de ayuno todos los animales se encontraban en el cuarto día de ayuno y con un período de 24, 48, 72 ó 96 horas desde el momento de la inyección de la FHA. La suspensión de células de la medula ósea y del bazo se obtuvo suspendiendo los mismos en solución Tyrode y ajustando la concentración por dilución con esa solución. 2×10^5 células medulares y 10^6 células esplénicas contenidas en 0,5 ml de suspensión fue la dosis de células inyectadas en todos los casos. Los grupos de animales que sirvieron de control fueron inyectados con igual número de células procedentes de dadores en ayuno pero sin tratamiento con FHA. Otros grupos de receptores recibieron igual número de células de suspensiones obtenidas del bazo de dadores tratados 48 horas antes con FHA a las cuales se sometió a un procedimiento de fraccionamiento para obtener una fracción que fuera rica en elementos de mayor tamaño. Esto se logró por centrifugación breve de acuerdo con el siguiente protocolo: Una vez obtenida la suspensión de células (1 bazo en 10 ml de Tyrode) se procedió a centrifugar la suspensión a 800 rpm durante 30 segundos para separar los restos de estroma. El sobrenadante (9 ml) se sometió a una segunda centrifugación de sólo 3 minutos. Al término se aspiraron los 3 ml superiores de la suspensión y los 3 ml del fondo, desechándose la fracción intermedia. La concentración celular en cada una de las dos fracciones se ajustó por dilución, determinándose la capacidad de trasplante de ambas fracciones por administración de una dosis de 10^6 células de cada receptor.

De cada una de las fracciones se tomó una alícuota que se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos y se desechó el sobre-

nadante. Las células fueron resuspendidas en 1 ml de solución Tyrode y se fijaron durante un minuto por agregado de 1 ml de la solución siguiente: ClNa, 0,76 g; citrato de sodio $2H_2O$, 0,60 g; formol 40 %, 1,125 ml; ácido pícrico al 1 % en alcohol 95°, 1,125 ml; agua destilada hasta 75 ml. Después de concentrar por centrifugación las células se procedió a efectuar un extendido en portaobjeto que se secó al calor y se coloreó con May Grunwald-Giemsa. Utilizando un ocular provisto de un retículo se estimó la proporción porcentual en cada fracción de células con diámetros menores de 8 μ , entre 8 y 12 μ y mayores de 12 μ .

Preparación de los recipientes. Se utilizó la técnica descrita por SANTOS *et al.* (13). Cada receptor recibió 24 horas antes del trasplante por vía intraperitoneal una dosis de 350 mg/kg de ciclofosfamida (CF)* conjuntamente con 50 mg/kg de busulfán (BS)**. Siete días después del trasplante se procedió a inyectar cada animal con 0,25 μ C de Fe^{59} por vía intravenosa y 3 horas después se sacrificaron por fractura cervical extrayéndose el bazo que después de pesado fue fijado en solución Bouim. En los mismos, se determinó la incorporación de radiohierro, la cual se calculó como por ciento de la dosis inyectada y a continuación se procedió a contar el número de colonias aparentes en la superficie, de acuerdo a la técnica descrita por TILL y McCULLOCH (15).

EFFECTOS DE LA FHA SOBRE LA CAPACIDAD DE REPOBLACIÓN ENDÓGENA.

Se determinó los efectos del pretratamiento con FHA sobre la capacidad de repoblación endógena de animales con aplasia hemopoiética causada por la inyección de los citostáticos. Para ello, unos grupos de animales recibieron una inyec-

ción de FHA 24, 48 ó 72 horas antes de la inducción de la aplasia hemopoiética por la inyección de CF y BS en las dosis anotadas más arriba y 7 días después se inyectó Fe^{59} . Tres horas más tarde se extrajo el bazo determinándose peso, porcentaje de incorporación de Fe^{59} y número de colonias como más arriba se indica. Otro grupo de animales que sirvió de control recibió solamente el tratamiento con citostáticos.

La EP utilizada fue plasma de conejo anémico, cuya actividad se determinó por comparación con un patrón de EP (International Reference Preparation). En todos los casos la dosis unitaria utilizada fue 0,5 unidades.

La FHA fue un extracto de *Phaseolus vulgaris* obtenido según la técnica de RAZAVI (11). En experimentos pilotos se encontró que el peso del bazo alcanzó su valor máximo 3 días después de la administración de 0,3 ml de FHA por vía endovenosa. Dosis mayores no produjeron mayor aumento y sí, en algunos casos, menor efecto sobre este parámetro.

Resultados

La administración de FHA causó en todos los casos un aumento del peso del bazo que fue máximo entre las 48 y 72 horas siguientes a la inyección. Veinticuatro horas después de la administración de la FHA se inició la aparición de elementos linfáticos de tamaño mayor que el normal y a las 48 y 72 horas se observó la aparición de abundantes elementos de apariencia blastoidea, coincidiendo el cuadro de la composición celular con la descripción hecha por GAMBLE (5). El estudio de la composición celular muestra, asimismo, un modesto aumento de eritroblastos y focos mieloproliferativos. En los animales que recibieron solamente EP los aumentos de peso del bazo (fig. 1) se acompañan fundamentalmente de un incremento de la población eritroblástica. En el grupo que recibió FHA y EP los cam-

* Endoxan Asta.

** Myleran Burroughs Wellcome & Co.

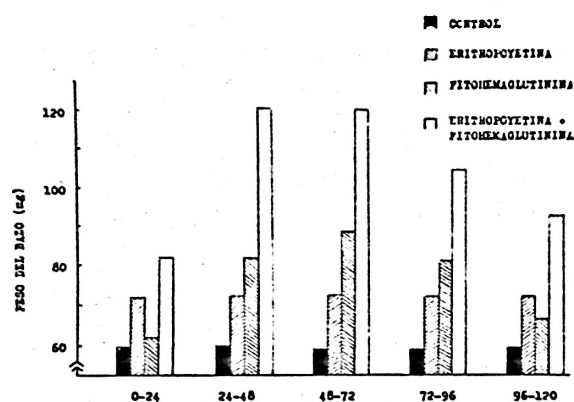


Fig. 1. Efectos de la FHA sobre los incrementos del peso del bazo causados por la EP. Las cifras debajo de cada conjunto de barras indica el número de horas transcurridas entre la inyección de FHA y la primera y segunda inyección de EP.

bios en el peso del órgano son mayores aún que los observados en los que recibieron solamente EP o FHA y en la composición celular se observó la coexistencia de numerosos elementos linfoblastoides y normoblásticos que fueron particularmen-

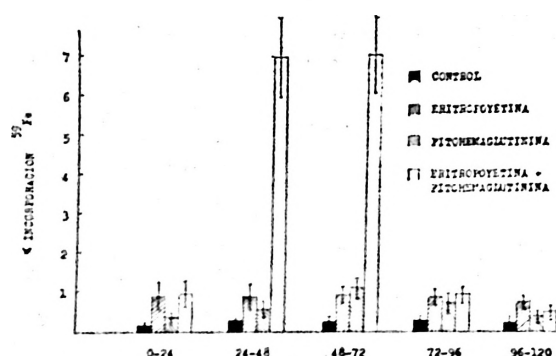


Fig. 2. Efectos de la FHA sobre los incrementos de incorporación de Fe^{59} por el bazo causada por la EP.

Las cifras debajo de cada conjunto de barras indican el número de horas transcurridas entre la inyección de FHA y la primera y segunda inyección de EP. Los segmentos al tope de cada barra representa el valor del Error Standard.

te numerosos en el grupo que recibió FHA dos y tres días antes de la EP.

La incorporación de Fe^{59} al bazo (figura 2) mostró, después de una declinación en los grupos que recibieron FHA 24 horas antes de la EP, un franco aumento tanto sobre los controles ($P < 0.001$) como sobre los valores encontrados en el grupo que recibió sólo EP o FHA ($P < 0.001$). Por el contrario, la medula ósea mostró en todos los tiempos estudiados una moderada disminución de la actividad que contrastó con los aumentos a nivel del bazo. La figura 3 muestra el comportamiento del área esplénica y medular que sigue a la administración de FHA y posterior estimulación por la EP.

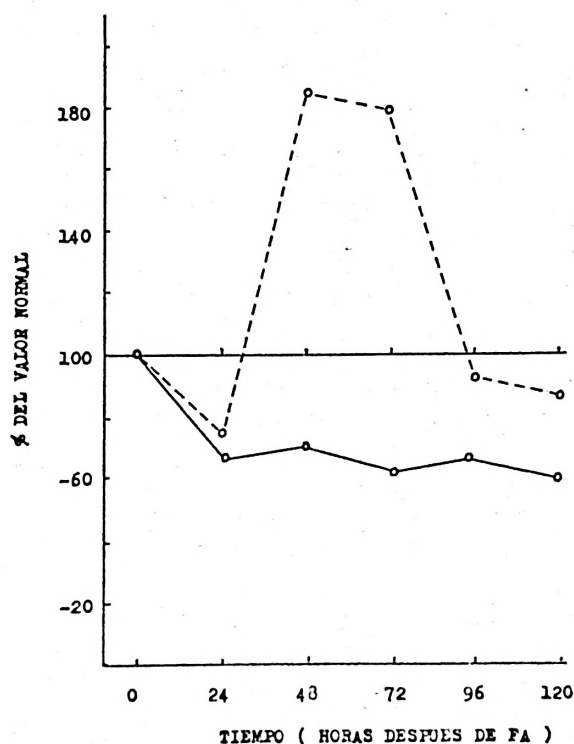


Fig. 3. Participación esplénica y medular en la respuesta a la EP de ratones pretratados con FHA.

Las cifras en la abscisa indican el número de horas transcurridas entre la inyección de FHA y la primera y segunda inyección de EP. Bazo ---; medula ósea —.

EFFECTOS DE LA FHA SOBRE EL POTENCIAL DE TRASPLANTE DE LAS CÉLULAS DEL BAZO Y DE LA MEDULA ÓSEA.

Cuando el tratamiento de los dadores con FHA se realiza 24 horas antes de preparar la suspensión de células para el injerto ocurre una pequeña pero no significativa reducción de la capacidad repobladora (fig. 4). Cuando la FHA fue administrada a 48, 72 ó 96 horas antes de la preparación de la suspensión de células esplénicas se observa un marcado aumento de dicha capacidad repobladora que se expresa por un aumento de los tres parámetros en estudio, es decir, peso del bazo, número de colonias y porcentaje de incor-

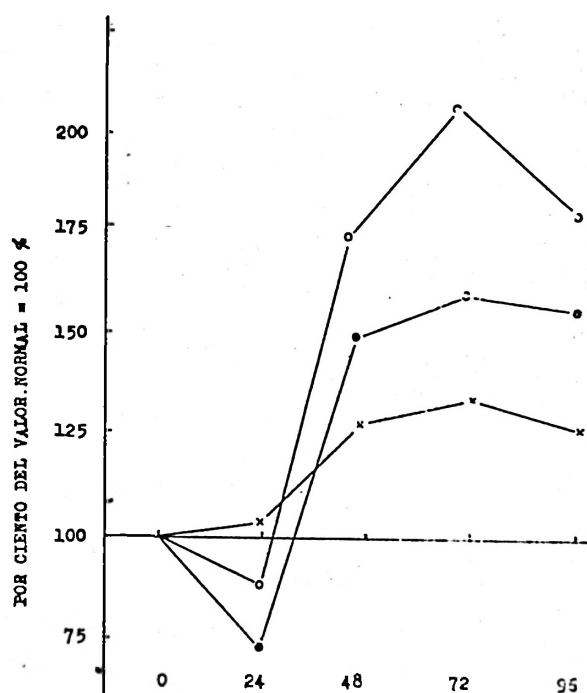


Fig. 4. Efectos de la FHA sobre la capacidad repobladora de las células del bazo.

Número de colonias —○—; incorporación de Fe⁵⁹ —●—; peso del bazo —X—. Las cifras en la abscisa indican los tiempos en que fue administrada la FHA y los valores en la ordenada se expresan como porcentaje de los valores producidos por el trasplante de igual número de células normales que se consideran como 100 %.

Tabla I. Efectos de la FHA sobre la celularidad total del bazo de ratones en el cuarto día de ayuno.

La FHA fue inyectada 24, 48, 72 y 96 horas antes de sacrificar los animales.

Tratamiento del dador	Número de células nucleadas ($\times 10^5$)	Factor de relación tratados normales
Ninguno	49,1	1,00
FHA		
24	50,1	1,01
48	72,0	1,46
72	76,0	1,54
96	58,1	1,20

poración de Fe⁵⁹. El número absoluto de células repobladoras de un bazo de un animal tratado debe estimarse no sólo por el grado de repoblación que produce un número dado de células sino también por la aplicación del factor de corrección que se deriva del número total de células encontradas en relación con las que existen en el bazo de un animal no tratado, factor que, en nuestro caso — como puede apreciarse en la tabla I que registra el número absoluto de células existentes en el bazo —,

Tabla II. Efectos de la FHA sobre la capacidad de repoblación hematopoiética de 2×10^5 células de la medula ósea trasplantada en huéspedes pretratados con CF-BS.

Tratamiento del dador	Potencial de trasplante ^a		
	N.º de colonias	Peso del bazo (mg)	% Fe ⁵⁹
Ninguno	18,8 $\pm$ 1,9 ^d	45,4 $\pm$ 3,9	2,20 $\pm$ 0,45
FHA			
24 ^b	16,6 $\pm$ 1,8	47,4 $\pm$ 2,1	1,01 $\pm$ 0,85
48	24,6 $\pm$ 2,8	54,3 $\pm$ 2,9	3,10 $\pm$ 0,92
72	25,7 $\pm$ 3,4	61,0 $\pm$ 5,9	3,35 $\pm$ 0,90
96	19,2 $\pm$ 1,9	51,5 $\pm$ 3,0	0,60 $\pm$ 0,40
Sin tratamiento ^c	1,4 $\pm$ 0,6	33,2 $\pm$ 1,9	0,10 $\pm$ 0,03

^a Medido por la hematopoesis presente en el bazo 7 días después del trasplante.

^b Horas transcurridas entre la administración de FHA y la preparación de la suspensión de células.

^c Los animales en este grupo reciben solo CF-BS.

^d Promedio; $\pm$ Error standard para grupos de 8 a 10 ratones cada uno.

Los valores subrayados difieren de los del grupo sin ningún tratamiento por P igual o menor que 0.05.

Tabla III. Efectos del fraccionamiento por centrifugación de la suspensión de células esplénicas del ratón (en el 4.º día de ayuno y tratado 48 horas antes con FHA) sobre el potencial de trasplante y la distribución porcentual de células de acuerdo a su diámetro.

Diámetros celulares μ	Fracción	
	Alta %	Fondo %
8	56,1	48,3
8 a 12	40,0	37,0
12	3,9	15,0
	Potencial de trasplante	
N.º de colonias	5,9 $\pm$ 3,7	21,2 $\pm$ 6,4
Peso del bazo	49,8 $\pm$ 5,4	75,4 $\pm$ 8,0
% Fe ⁵⁹	0,9 $\pm$ 0,3	5,4 $\pm$ 1,9

es igual a 1,46, 1,54 y 1,20 a las 48, 72 y 96 horas, respectivamente, después del tratamiento con FHA.

De igual manera a lo que acontece en el bazo, en la medula ósea existe un aumento del potencial de trasplante que se hace aparente a las 48 horas y persiste hasta las 96 horas (tabla II). En esta área de la hemopoiesis, sin embargo, los incrementos son menores y en el conjunto de observaciones los resultados no son congruentes en la misma medida de lo que ocurre en el bazo, existiendo una mayor dispersión de los valores individuales.

RESULTADO DEL FRACCIONAMIENTO DE LA SUSPENSIÓN DE CÉLULAS ESPLÉNICAS.

La fracción con mayor velocidad de sedimentación y que contiene el más alto porcentaje de células con diámetro por encima de 12 μ tiene, al mismo tiempo, un potencial de trasplante varias veces mayor que la fracción con menor velocidad de sedimentación (tabla III).

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON FHA SOBRE LA CAPACIDAD DE REPOBLACIÓN ENDÓGENA.

El tratamiento con los citostáticos utilizados en este estudio muestra que, 7 días

después del mismo, se encuentra un promedio de una colonia por bazo como consecuencia de endocolonización, en una serie de 94 animales. En la figura 5 se muestran los valores de la capacidad de repoblación endógena estimada a través del peso del bazo, número de colonias y capacidad para incorporar Fe⁵⁹ al bazo siete días después del tratamiento supresor con citostáticos. Puede verse que, cuando la FHA fue administrada 24 horas antes del tratamiento supresor, no se observa cambio en la capacidad de repoblación endógena con relación a los valores en-

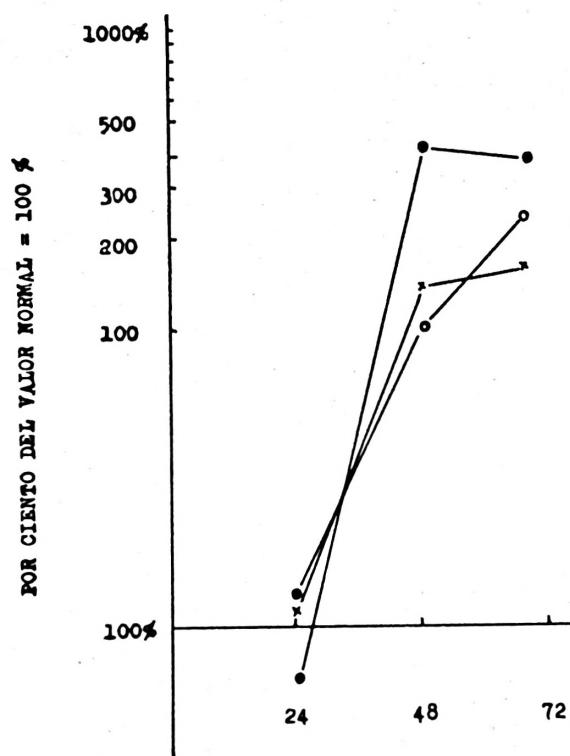


Fig. 5. Efectos de la FHA sobre la capacidad de repoblación endógena.

Número de colonias —○—; % de incorporación de Fe⁵⁹ —●—; peso del bazo —×—. En ordenadas, tiempos transcurridos entre la administración de la FHA y la inducción de la aplasia hemopoiética. En la ordenada se expresan en escala logarítmica los valores como porcentaje de los encontrados en animales con aplasia pero sin pretratamiento con FHA.

contrados en el animal normal. En cambio, cuando la FHA se administró 48 y 72 horas antes de la inducción de la aplasia hemopoiética la recuperación endógena medida a través del número de colonias aumentó en una relación de 15 a 1 con respecto a los valores encontrados en los animales que no recibieron FHA.

Discusión

La posibilidad de que algunos elementos de la población de linfocitos posean la capacidad de funcionar como elementos progenitores de las líneas mieloideas de la hemopoiesis (*Stem cell* hemopoiética), ha recibido en fecha reciente el interés de numerosos investigadores (10-13). No existe, sin embargo, evidencia directa de que el linfocito pueda transformarse en otras líneas celulares. Los estudios cuyos resultados aquí comunicamos dan apoyo a la postulada relación entre el linfocito y la *Stem cell* hemopoiética. Con tal propósito se ha recurrido a la introducción de una perturbación en la población de linfocitos causada por la FHA. Se utilizó el ratón en ayuno como animal de experimentación en razón de que, en esa condición, la eritropoyesis que se cumple en el área esplénica y que normalmente es sustancial en esta especie, queda reducida a un mínimo. Además, la composición celular del órgano adquiere una gran uniformidad por desaparición casi total de otros elementos distintos de los linfocitos. Esta circunstancia permite que los elementos blastosímiles producidos por la FHA, entre cuyas características figura un notable aumento de su tamaño sean más fácilmente reconocibles de otros elementos celulares no transformados. Por otra parte, la respuesta esplénica a la eritropoyetina durante el ayuno es muy pobre, circunstancia que permite evaluar con facilidad los incrementos que en ella pueda acarrear la administración de la FHA.

La acción de la FHA sobre la composición celular del bazo produce *in vivo*

cambios que siguen muy de cerca los observados cuando se agrega FHA a cultivos de linfocitos, tanto en lo que se refiere a la cronología de los cambios como a la apariencia morfológica de los elementos transformados. Resulta claro que, después de un período de latencia (a las 24 horas no se aprecian aún cambios significativos), a las 48 y 72 horas se comprueba en la condición de ayuno un cambio en el peso del bazo y en su composición celular similar al ya observado en el animal normal (5). La respuesta a la administración de eritropoyetina no cambia en animales con 24 horas de pretratamiento con FHA pero adquiere una gran magnitud cuando es administrada a animales con 48 ó 72 horas de pretratamiento con el extracto. Esta gran respuesta contrasta con la muy limitada respuesta que sigue a la administración de EP a los animales ayunados pero sin pretratamiento con FHA, indicando que ésta es capaz de producir a nivel del bazo un cambio que resulta en una mayor respuesta a la hormona estimulante de eritropoyesis. Dicho cambio es paralelo cronológicamente con la aparición de los elementos celulares blastosímiles y también retrocede paralelamente con la desaparición de tales elementos transformados sugiriendo que, en esos períodos, existe en el bazo un mayor número de *Stem cell* hemopoiéticos ya que la respuesta a la eritropoyetina se admite actualmente que es un índice de la dimensión de dicha población celular (6). El aumento de la actividad eritropoyética a nivel del bazo que sigue a la administración de FHA a ratones normales (5) ha sido interpretada como consecuencia de un aumento en la proliferación de los normoblastos preexistentes causada por la estimulación inespecífica de la FHA sobre las mitosis de esa población. Nuestras observaciones no concuerdan con esa interpretación ya que en ellas se comprueba que el incremento de la eritropoyesis que produce la FHA se cumple principalmente en el bazo donde el ayuno

ocasiona una casi total erradicación de la eritropoyesis, mientras que, en el sector medular donde persiste una sustancial fracción de la población de normoblastos y donde la supuesta acción inespecífica de la FHA podría por ello revelarse en mayor grado, se encuentra poco o ningún cambio tanto por administración de FHA sola como tampoco en la respuesta a la inyección de eritropoyetina después del tratamiento con FHA.

Los resultados de la estimación de la dimensión de la población de *Stem cells* hemopoiéticas a través de la capacidad de trasplante así como también de la capacidad de endocolonización endógena son coincidentes con la observación anterior al mostrar que existe una significativa correlación entre la aparición y desaparición de los elementos blastosímiles y el aumento y disminución subsiguiente en la magnitud de la endocolonización en el bazo y en menor medida en la medula ósea. Por otra parte, cuando se procedió al fraccionamiento de las suspensiones celulares obtenidas del bazo 48 horas después del tratamiento con FHA, se encontró que, la fracción con mayor velocidad de sedimentación y que al mismo tiempo mostró contener el más alto número de elementos de mayor diámetro y con las características del linfocito con transformación blastoidea, es la que posee el más alto grado de capacidad de repoblación exógena.

La función de *Stem cell* hemopoiética ha sido asignada a una fracción de los «linfocitos medulares» (1, 3, 4, 16). Nuestras observaciones indican que es en el sector esplénico en el que los efectos de la FHA es capaz de producir un incremento de tal población de progenitores, efecto que se cumple en esta área de la eritropoyesis en una medida que resulta mucho más evidente y con mayor constancia que en el área medular. La respuesta a la eritropoyetina en este último sector en animales pretratados con FHA resulta aún algo disminuida cuando la actividad esplénica

es alta. Tal discrepancia puede ser sólo aparente y estar relacionada con un aumento en la competición por el hierro que resulta del agrandamiento del área esplénica. Otros estudios en los que además de la capacidad de incorporación de hierro se incluyan la medida de otros parámetros indicativos de la medida del eritrón a nivel de la medula pueden ser de utilidad para aclarar esta aparente discrepancia.

Aunque de estos resultados no se desprende una evidencia directa de que la transformación blastoide que experimentan los linfocitos esplénicos les confiere a estos elementos la cualidad de *Stem cell* hemopoiética, los mismos son fuertemente indicativos en tal sentido al evidenciar que ambos ocurren con tan estrecho paralelismo.

Resumen

En el plazo de 48 a 72 horas que sigue a la administración de fitohemaglutinina a ratones en ayunas ocurren cambios a nivel del bazo similares a los observados después de la inyección de fitohemaglutinina a ratones normales. En este mismo período la respuesta eritropoyética del bazo a la inyección de eritropoyetina resulta notablemente aumentada, coincidentemente se comprueba un significativo aumento de la concentración de *Stem Cells* en este órgano. Se discute la posibilidad de que los elementos transformados puedan adquirir la cualidad de progenitores de la línea eritropoyética y dar origen a elementos eritroides bajo el estímulo de la eritropoyetina.

Bibliografía

1. BENNETT, M. y CUDKOWICS, G.: *J. Cell. Physiol.*, **72**, 129, 1968.
2. BYRON, J. W. y LAJTHA, L. G.: *Blood*, **20**, 102, 1962.
3. CUDKOWICS, G., BENNETT, M. y SHEARER, G. M.: *Science*, **144**, 866, 1964.
4. CUDKOWICS, G., UPTON, A. C., SHEARER, G. M. y HUGHES, W. L.: *Nature*, **201**, 165, 1964.
5. GAMBLE, CH. N.: *Blood*, **28**, 175, 1966.
6. GURNEY, C. W. y HOFSTRA, D.: *Radiat. Res.*, **19**, 599, 1963.

7. MCINTYRE, O. R. y EBAUGH, F. G.: *Blood*, **19**, 443, 1962.
8. NOWELL, P. C.: *Cancer Res.*, **20**, 462, 1960.
9. POLGAR, P. y KIBNICK, S.: *Nature*, **225**, 857, 1970.
10. QUAGLIANO, D., HAYHOE, F. C. J. y FLEMANS, R. J.: *Nature*, **196**, 338, 1962.
11. RAZAVI, L.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, **118**, 717, 1965.
12. ROBINS, J. H.: *Science*, **146**, 1648, 1964.
13. SANTOS, W. G. y HAGHSHEENASS, M.: *Blood*, **32**, 629, 1968.
14. SCARO, J. L.: *Acta Physiol. Lat.-Amer.*, **18**, 341, 1968.
15. TILL, J. E. y MCCULLOCH, E. A.: *Rad. Res.*, **14**, 213, 1961.
16. YOFFEY, J. M., JEFFREYS, R. V., OSMOND, D. G., TURNER, M. S., TAHSIN, S. C. y NIVEN, P. A. R.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **149**, 179, 1968.

