

Hematopoesis en el ratón después de la administración de Busulfán

M.^a C. Buys, M. A. Carrera, E. E. Guidi, C. E. Miranda, A. R. Alvarez y J. L. Scaro

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

(Recibido el 9 de septiembre de 1976)

M.^a C. BUYS, M. A. CARRERA, E. E. GUIDI, C. E. MIRANDA, A. R. ALVAREZ and J. L. SCARO. *Erythropoiesis in the Mouse Following Chronic Administration of Small Doses of Busulphan*. Rev. esp. Fisiol., 33, 163-168. 1977.

After both splenectomized and non-splenectomized mice had received a total amount of five doses of Busulfan at a rate of 0.14 mg/48 h, the recovery of their erythropoietic organs through the addition of ⁵⁹Fe was investigated, after the cytostatic treatment had been cut off.

In the non-splenectomized animals recovery was clear, keeping high ⁵⁹Fe uptake values, significantly above normal, throughout the 21 days of the experiment.

In the splenectomized mice, ⁵⁹Fe uptake reached a peak of 38 per cent three days after the supply had been cut off, and from then on it descended to subnormal values.

Existe amplia información experimental acerca de los efectos de una dosis alta de Busulfán (BS) sobre la hematopoesis de pequeños roedores (2, 6, 7, 9). Se consideró que el estudio de los efectos de la administración fraccionada de esa dosis añadiría información acerca de la cinética de los elementos celulares hemopoiéticos. Esta información puede además aportar nuevos enfoques para la utilización terapéutica del citofármaco.

Se comunican aquí los resultados del estudio de la regeneración eritropoyética que sigue a la administración repetida de pequeñas dosis de BS en ratones.

Material y métodos

Se utilizaron ratones hembras (C3 H/FWD) F₁ de 8 a 10 semanas de edad del criadero de este Instituto. El BS se administró por sonda gástrica a razón de 0,14 mg por día en días alternos hasta totalizar cinco dosis. Los animales se separaron en jaulas de cinco animales cada una con acceso a dieta normal. Tres, 7, 15 y 21 días después de interrumpir la administración de la droga se administró a cada animal 0,15 μ C de Fe⁵⁹, sacrificándose 3 horas después. Se hicieron las siguientes determinaciones: a) Dimensión

de la población eritroidea, medida por la tasa de hemoglobinosíntesis, evaluándose esta última por la incorporación de Fe^{59} a los órganos eritropoyéticos; *b*) Evaluación de la eritropoyesis efectiva a través de la medida de reticulocitos circulantes y del hematocrito; *c*) Cambios de la celularidad total y composición celular diferencial de la médula ósea; *d*) Concentración de *Stem Cells* hemopoiéticas en la médula ósea y el bazo por medio del *cloning* esplénico (11); *e*) Distribución topográfica del Fe^{59} para el cálculo del índice de HOGDSON (8).

La celularidad medular se determinó en hemocitómetro y el recuento diferencial mielo-eritroide se hizo en frotis realizados con el contenido medular de un fémur y coloreados con May-Grünwald-Giemsa. Para los hematocritos se recurrió al micrométodo y los reticulocitos se contaron en preparaciones húmedas, coloreándolos con azul brillante de cresil.

Estudios similares se efectuaron en ratones con esplenectomía antigua (120 días).

Resultados

En todos los ratones no esplenectomizados hay un aumento significativo en el porcentaje de incorporación de Fe^{59} a los eritrocitos circulantes, así como en las áreas esplénica y medular (fig. 1). La médula, a pesar de disminuir un 5% del valor normal en el día 3, en las determinaciones posteriores aumenta a un 65, 47 y 30% en los días 7, 15 y 21, respectivamente. Con el bazo ocurre algo similar, pero la disminución del 5% se observa en el día 7, mientras que en las determinaciones siguientes aumenta a un 12, 50 y 75%.

En los eritrocitos siempre los valores fueron muy superiores a los normales (200, 216, 233 y 250%), en los días observados. Estos cambios en el porcentaje de incorporación de Fe^{59} indican una activa expansión eritroblástica en estos

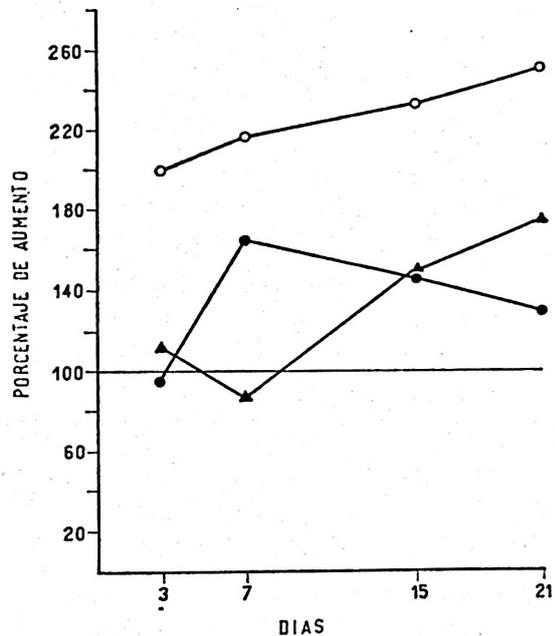


Fig. 1. Incorporación de Fe^{59} en diferentes órganos eritropoyéticos de ratones no esplenectomizados.

Cada punto marca el porcentaje de incorporación de Fe^{59} , en animales que recibieron dosis fraccionadas de Busulfán (0,14 mg/día), con respecto a los valores normales representados por la línea horizontal. Médula (●); bazo (Δ); eritrocitos (O). Valores medios de 20 determinaciones.

últimos. Los valores registrados en médula ósea son claramente superiores a los valores normales, especialmente en el séptimo día para retroceder gradualmente en los días sucesivos pero sin regresar a la normalidad, ni aun en el día 21 posterior a la última administración de BS. En el bazo ocurre un aumento similar en todos los tiempos observados durante el período experimental.

Los valores promedios del hematocrito y reticulocitos registrados (tabla I) fueron prácticamente normales durante toda la experiencia, indicando que en todo el período de observación, la eritropoyesis fue efectiva. En la misma tabla pueden verse los valores de la celularidad medular total

Tabla I. Hematocrito, recuento de reticulocitos, celularidad medular y relación mielo-eritroide de animales no esplenectomizados y esplenectomizados que recibieron dosis fraccionadas de Busulfán.

Valores medios \pm error estándar. Entre paréntesis, número de determinaciones.

| Tiempo Días | Hematocrito % | Reticulocitos % | Celularidad medular $\times 10^6$ /fémur | Relación mielo-eritroidea |
|------------------------------------|---------------|-----------------|--|---------------------------|
| Animales no esplenectomizados (20) | | | | |
| 3 | 42,74 | $2,12 \pm 0,28$ | $10,6 \pm 2,4$ | 100/30 |
| 7 | 41,94 | $4,95 \pm 0,56$ | $9,7 \pm 0,9$ | 100/38 |
| 15 | 40,40 | $3,74 \pm 0,73$ | $8,7 \pm 0,4$ | 100/17 |
| 21 | 41,93 | $1,92 \pm 0,26$ | $9,4 \pm 1,2$ | 100/20 |
| Animales esplenectomizados (12) | | | | |
| 3 | 40,13 | $1,00 \pm 0,40$ | — | — |
| 7 | 36,60 | $7,60 \pm 1,96$ | $4,4 \pm 0,6$ | 100/16 |
| 15 | 29,85 | $1,75 \pm 0,45$ | $6,7 \pm 1,0$ | 100/15 |
| 21 | 37,81 | $2,45 \pm 0,17$ | $6,7 \pm 0,5$ | 100/19 |

* Días después de la interrupción de la administración de Busulfán

y de la relación mielo-eritroide de la misma. El número total de células nucleadas resultó disminuido en todos los tiempos investigados. La relación mielo-eritroide, aunque conservándose cerca de la normalidad, mostró un valor mínimo el día 7.

La incorporación de Fe^{59} a médula, después de la administración de BS resultó, en los ratones esplenectomizados, aumentada en un 38 % en el día 3, experimentando posteriormente una caída significativa con respecto a los valores normales (17 %), que se mantuvo desde el día 7 hasta la última observación realizada. En los ratones no esplenectomizados los resultados mostraron ser superiores a los normales durante todo el período experimental (fig. 2). La correlación estadística entre los valores de incorporación de Fe^{59} a médula en ambos grupos fue significativa (día 1: $P < 0,05$, día 7: $P < 0,01$, día 15: $P < 0,01$, día 21: $P < 0,001$).

En los ratones esplenectomizados se observó asimismo una reducción concomitante de la incorporación de radio-

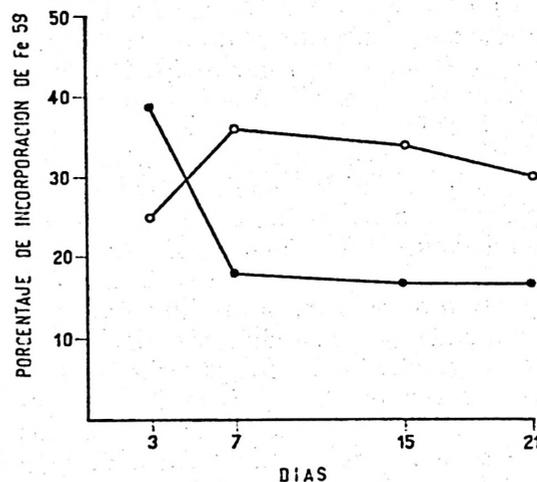


Fig. 2. Incorporación de Fe^{59} en médula de ratones esplenectomizados y no esplenectomizados que recibieron dosis fraccionadas de Busulfán.

Valores medios de 12 determinaciones. Esplenectomizados (\bullet); no esplenectomizados (\circ).

hierro a los eritrocitos circulantes y de los valores del hematocrito. Los reticulocitos se mantuvieron durante los demás tiempos de la observación a niveles similares a los encontrados en los animales no esplenectomizados con excepción del día 7 en que se encontraron aumentados. La celularidad medular resultó manifiestamente inferior en los grupos esplenectomizados y la fracción eritroidea de los mismos fue asimismo menor (tabla I).

La reducción de los valores absolutos de los elementos eritroides de la médula ósea coinciden con la caída brusca de la capacidad de incorporación de Fe^{59} .

Discusión

Observaciones previas en este laboratorio han mostrado que una sola dosis de BS de 2.5 mg por animal causa en el ratón una supresión hematopoiética que persiste durante 2 a 3 semanas. Durante ese período hay ausencia en la médula

ósea y en el bazo de *Stem Cell* hematopoiéticas (Células formadoras de colonias o CFU). Sin embargo, la aplicación de un estímulo eritropoyético adecuado a continuación de la intoxicación, causa una respuesta significativa en este sector. Esta respuesta tiene un curso abortivo y se ha interpretado como consecuencia de la estimulación de las *Stem Cell* eritroides (SCE), las cuales, a diferencia de las CFU, persisten y retienen su aptitud funcional a pesar de la acción citotóxica del BS (2).

Los resultados de los experimentos en que se administra el BS en forma fraccionada muestran que, en las tres semanas que siguen a su administración, aparece una ligera disminución del hematocrito, lo que hace razonable asumir la existencia de un aumento en el estímulo endógeno a la eritropoiesis. La tasa de ésta se muestra francamente por encima de lo normal, indicando la capacidad de respuesta a dicho estímulo. El incremento de la actividad eritropoyética, medida por la incorporación de Fe^{59} se observa tanto en la medula como en el sector esplénico. Debe mencionarse el comportamiento del área medular que difiere de lo que se observa en el animal normal frente a estímulos de la eritropoyesis. En esta última condición el aumento de la actividad se cumple primordialmente en el bazo, la medula no muestra cambios; eventualmente si ocurre alguno, éste consiste en una ligera disminución de la capacidad de incorporar Fe^{59} por debajo de los valores normales (12).

En estos estudios se comprueba, en cambio, que asociándose al incremento esplénico ocurre un notable aumento en el área medular.

Existen comunicaciones anteriores acerca del fracaso medular en ratones esplenectomizados (1, 3, 4).

Para la interpretación de la participación de las dos áreas, medular y esplénica en la eritropoyesis en esta especie, se ha sugerido que la amplia participación esplénica obedece a que en condiciones nor-

males el ámbito medular no da cabida, por estar totalmente ocupado, a ninguna expansión de la eritropoyesis (5).

La amplia respuesta medular encontrada por nosotros aparece a primera vista como una contradicción al concepto citado. Se debe, sin embargo, tener en cuenta si las condiciones de celularidad total en la medula no están modificadas por el citotóxico. Así lo indican las cifras de dicha celularidad que muestran una notable reducción de la misma. Esta comprobación aparecería apoyando el concepto antes mencionado de que normalmente falta espacio en el ámbito medular para desarrollar en esa área una mayor población eritropoyética. Al estar reducida la población medular en líneas no eritropoyéticas, esto crearía el espacio necesario para la expansión observada en la medula en estos estudios.

Sin embargo, esta interpretación no encuentra apoyo en los resultados obtenidos en animales esplenectomizados. En este caso, después de un aumento transitorio al comienzo del período experimental, la eritropoyesis medular se redujo en medida remarcable, cayendo a niveles subnormales. Asociándose a esta reducción en la incorporación de Fe^{59} por la medula se comprobó valores del hematocrito y de los reticulocitos también inferiores a los encontrados en los grupos no esplenectomizados. La reducción de todos estos parámetros se asoció además a una mayor reducción en la celularidad total de la medula. Este último dato resta apoyo a la explicación adelantada en el sentido de que el incremento franco de la tasa eritropoyética medular en los grupos no esplenectomizados obedecía a que la disminuida celularidad medular daba cabida a la expansión eritropoyética inducida por la ligera reducción del hematocrito. En los animales esplenectomizados esta reducción resultó mayor; de ello podría inferirse un estímulo también mayor a la eritropoyesis. Sin embargo, lo observado es una reducción.

Frente a estas comprobaciones resulta razonable suponer que el fracaso medular observado puede estar relacionado a la ausencia del bazo. Siguiendo esta línea de razonamiento podría inferirse que la emigración de elementos progenitores que desde la medula son transportados al bazo (10) encuentran, cuando éste está presente, un área en la cual pueden desarrollar una activa eritropoyesis. Al cumplirse ésta el bazo enviaría por vía humoral a la medula una información frenadora de la emigración. Al reducirse ésta los elementos evolucionarían *in situ* dando lugar así a la expansión medular.

En el animal esplenectomizado la emigración de elementos celulares primitivos provenientes de medula continuaría sin lograr el desarrollo del sector extramedular. El bazo constituiría así parte de un sistema espleno-medular y su ausencia llevaría a la emigración descontrolada desde la medula con la consecuencia de un vaciamiento de este sector.

Se continúan estudios encaminados a lograr mayor información que de apoyo a esta interpretación.

Resumen

Se investigó en ratones esplenectomizados y no esplenectomizados que recibieron un total de cinco dosis de Busulfán a razón de 0,14 mg por día, la recuperación de sus órganos eritropoyéticos, medida a través de la incorporación de Fe^{59} después de interrumpido el tratamiento citostático.

En los animales no esplenectomizados la recuperación fue franca, manteniéndose con altos valores de incorporación de Fe^{59} , significativa-

mente por encima de la normalidad, durante los 21 días de duración de la experiencia.

Estos resultados contrastan con los hallados en los ratones esplenectomizados, en los que luego de alcanzar un pico que llega a 38 % de incorporación de Fe^{59} en el tercer día después de interrumpida la administración de Busulfán, desciende a valores subnormales (17 %) en las observaciones siguientes.

Bibliografía

1. AGGIO, M. C. y GARCÍA, N. E.: *Rev. esp. Fisiol.*, 25, 239-244, 1969.
2. BARRIO RENDO, M. E., DE TOMBOLESI, A. R. A. P. y SCARO, J. L.: *Acta Physiol. Lat. Amer.*, 23, 327-333, 1973.
3. BOZZINI, C. E., MARTÍNEZ, M. A., ALIPPI, R. M. y CHAIT, R.: *Acta Physiol. Lat. Amer.*, 22, 200-205, 1972.
4. BOZZINI, C. E., BARRIO RENDO, M. E., DEVOTO, F. C. H., y EPPER, C. E.: *Amer. J. Physiol.*, 219, 724-728, 1970.
5. BOZZINI, C. E. y ALIPPI, R. M.: *Acta Physiol. Lat. Amer.*, 21, 198-202, 1971.
6. DUNN, C. D. R. y ELSON, L. A.: *J. Cell Physiol.*, 76, 215-224, 1970.
7. ELSON, L. A., CALTON, D. G. A. y TILL, M.: *Br. J. Haemat.*, 4, 355-374, 1958.
8. HODGSON, G. S. y ESKUCHE, I.: En «Erythropoiesis». (JACOBSON, L. O., DOYLE, M., eds.) Grune and Stratton, Nueva York, 1962, 222-227.
9. MEDICI, P. T., HURST, J. M. y PILIERO, S. J.: *Acta Haemat.*, 33, 167-177, 1965.
10. RENCICCA, N. J., RIZZOL, V., HOWARD, D., DUFFY, P., STOHLMAN, F., JR.: *Blood*, 36, 764-771, 1970.
11. SANTOS, G. W. y HAGSNASS, M.: *Blood*, 32, 629-673, 1965.
12. SCARO, J. L.: *Acta Physiol. Lat. Amer.*, 18, 341-344, 1968.

