

24. 96

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS

"CARACTERIZACION DEL TEJIDO  
MIELOIDE DE RATON"

T E S I S

Que para obtener el titulo de  
B I O L O G O  
P r e s e n t a

MA. ESTHER LERDO DE TEJADA BRITO



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODO	3
RESULTADOS	8
DISCUSION	18
RESUMEN Y CONCLUSIONES	27
ADDENDUM ESTADISTICO	28
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	29

## INTRODUCCION

Los componentes celulares de la sangre: eritrocitos, leucocitos, linfocitos y plaquetas son constantemente cambiados o destruidos ya sea porque así cumplen con su función como es el caso de los neutrófilos o porque sufren "envejecimiento" con pérdida de su capacidad funcional como sucede con los glóbulos rojos (14).

Este recambio continuo implica la existencia de un sistema de auto-renovación con órganos especializados en la formación de las células de la sangre y por ende llamados órganos hematopoyéticos. Es en estos órganos como el bazo, timo, médula ósea, ganglios linfáticos, y nódulos linfáticos que ocurren los procesos de proliferación, diferenciación y

maduración de los componentes celulares sanguíneos. Dada - la importancia de las funciones de las células sanguíneas en el mantenimiento de la homeostasis, la hematopoyesis ha sido ampliamente estudiada y se ha convertido incluso en uno de - los modelos mejor estudiados de cinética celular. (33)

El modelo hematopoyético vigente se ha establecido - con base en experimentos realizados en las especies murinas, - principalmente el ratón (27,28,29) es por ello que el estudio hematológico detallado de esta especie ha adquirido gran im- - portancia; sin embargo, dada la gran cantidad de variantes - existentes no solo en los métodos de estudio del tejido hema- topoyético sino también en factores tales como cepas del ratón (31), edad (30), sexo (31), etc. es indispensable antes de - iniciar experimentos con esta especie, caracterizar desde el punto de vista hematológico una población normal que servirá - como base de comparación con experimentos posteriores.

Es por esta razón que en este trabajo se informan - los resultados obtenidos de las determinaciones de sangre pe- riférica, tales como Hg, Ht, glóbulos rojos, plaquetas, leuco- citos y sus correspondiente diferenciales, así como el número total de células de médula ósea y sus respectivas diferencia- les del ratón híbrido F' (♀ BALB/c y ♂ DBA/2), el cual se - emplea frecuentemente con animal experimental en leucemias y - linfomas. A su vez se muestra la comparación de los valores - de las diferentes edades y sexos.

## MATERIAL Y METODO

Los ratones utilizados fueron ♂ y ♀ híbridos F' -- (♀ BALB/c y ♂ DBA/2) de diferentes edades proporcionados por el bioterio del Centro Médico Nacional del IMSS. El peso de los animales fué de 19-28 gr. Hasta el momento del estudio, los animales se mantuvieron en condiciones estandar de laboratorio, esto es, alimentación con Purina Chow\*1 y agua "ad libitum" en el bioterio con las condiciones siguientes: Luz/--obscuridad 12/12, temperatura  $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa de 45-50% y 10-15 cambios de aire por hora.

Los animales se exsangüinaron a través de la vena ca

\*1 Purina Laboratories.

va inferior con una jeringa impregnada con EDTA (etilendiamino tetracetato de sodio) al 5% en solución salina al 0.9%, bajo anestesia con Pentrane\*1. La sangre obtenida, generalmente 0.5 ml., se homogenizó y se efectuaron las determinaciones de hemoglobina, hematocrito, glóbulos rojos, leucocitos y plaquetas. En todas ellas y salvo que se indique lo contrario las diluciones se efectuaron usando micropipetas Eppendorf\*2, de volumen fijo. Al mismo tiempo se hicieron frotis sanguíneos para conteos diferenciales de leucocitos.

Determinación de glóbulos rojos. Se diluyeron primeramente 10  $\mu$ l. de sangre en 5 ml. de Isoton\*3 obteniéndose -- una dilución 1:500, después de ser bien homogenizada, se tomaron 10  $\mu$ l. que se diluyeron nuevamente en 10 ml. de Isoton resultando en una dilución final de 1:500,000. El conteo se hizo en un contador de partículas electrónico Coulter Counter - Modelo B, para cada animal se tomaron dos muestras que fueron contadas por triplicado. Los resultados se expresaron como - glóbulos rojos  $\times 10^6 / \mu$ l. de sangre.

Determinación de hemoglobina. (Hb). Se determinó -- por medio del método de cianometahemoglobina (6) diluyendo -- 20  $\mu$ l. de sangre en 5 ml. de la solución de Drabkin\*4, la --

- \*1 Metoxifluorano, Abbot laboratories
- \*2 Brinkmann Instruments Inc.
- \*3 Coulter Electronics, Inc. Hialeah Flo.
- \*4 Boehringer Mannheim GmbH Diagnostica



cual fue leída en un espectrofotómetro\*1 a 546 nm. después - de 3 min. y antes de 10 horas de preparada la solución. Los resultados se expresaron en g/100 ml. de sangre.

Determinación de hematocrito (Ht). Se efectuó por - el método de microhematocrito (24,25), usando capilares sin -- anticoagulante\*2. Estos tubos eran llenados aproximadamente - el 80% de su longitud y eran centrifugados a 11 000 rpm en -- una centrífuga especial para los capilares de hematocrito\*3 - durante 5 min. y posteriormente leídos en una tabla Critocap - \*4 . Los resultados se reportaron en porcentaje ( % ) del pa - quete celular.

Determinación de leucocitos. Con un diluctor automá - tico\*5 se preparó una dilución 1:500 usando Cetrimida\*6 como - diluyente y agente estromatolizante. Los conteos se hicieron por triplicado en un mínimo de dos muestras de sangre y los - resultados se informan como leucocitos/ $\mu$ l. de sangre.

Determinación de plaquetas. El método utilizado fué el de Brecher (4) y consistió en preparar una dilución 1:200 - en 2 ml. oxalato de amonio al 1% usando 10  $\mu$ l. de sangre. -- Realizando el conteo en un hemocitómetro, después de sedimen - tar durante 30 min. en cámara húmeda en contraste de fases y -

- \*1 Pye Unicam SP600 Series 2
- \*2 Propper Manufacturing Co. Inc.
- \*3 Sol Bat
- \*4 Sherwood Medical Industries Inc.
- \*5 Dilumat Fisher Inc.
- \*6 Eastman Kodak Co.

bajo el objetivo de 40 X. Los resultados obtenidos se informaron como plaquetas  $\times 10^3/\mu\text{l}$ . de sangre.

Conteo diferencial de leucocitos. Los frotis sanguíneos se realizaron en cubreobjetos de 22 x 22 mm. secándolos al aire. Se tiñeron con Wright y se hizo, después un conteo diferencial de mínimo doscientas células de cada frotis. Los resultados obtenidos se expresaron en cantidad total/ $\mu\text{l}$ . de sangre, para cada tipo de célula identificada.

Determinación de la celularidad en médula ósea. Una vez exsanguinado el ratón se sacrificó por dislocación cervical, disecándose las tibias que se limpiaron de las partes blandas.

Las tibias se cortaron a nivel de la fíbula. La cavidad medular fué lavada tres veces con una jeringa de 1 ml. y aguja 25 G conteniendo 1 ml. de medio Mc Coy 5A\*1 1X suplementado con 15% de suero fetal de ternera\*2; para el lavado de la cavidad medular se alternaba el extremo distal con el proximal. El número de lavados necesarios para obtener el mayor número de células de la médula fue determinado previamente.

El número total de células de la médula ósea de cada tibia se determinó de igual manera que los leucocitos. Los resultados se expresaron como células de médula ósea nuclea--

\*1 Gibco Co.

\*2 Flow Laboratories Inc.

das  $\times 10^6$ /tibia (8).

Conteo diferencial de células de médula ósea. La -- suspensión celular de cada hueso fué centrifugada a 1 500 -- rpm durante 5 min. en una centrífuga clínica; el sobrenadante se descartó y el botón celular se suspendió en unas gotas de suero fetal de ternera. De esta suspensión celular se hicieron frotis en cubreobjetos de 22 x 22 mm. que se tiñeron con Wright. De cada frotis, se hizo un conteo diferencial mínimo de 500 células, clasificandolas según Chevernick (8) y expresando los valores como cantidad total de células  $\times 10^3$ /tibia. En todas las tibias estudiadas se efectuó estudio histológico posterior, previa descalcificación.

Solo se efectuó control de calidad con los estándares disponibles que fueron el de Hb y leucocitos. En las diferenciales de sangre periférica y médula ósea se recontaron frotis al azar por un segundo observador y los resultados se compararon estadísticamente.

Análisis estadístico. Todos los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente usando la prueba de "t" para muestras independientes (7,32). Se utilizó el nivel de  $p < 0.01$  de significancia estadística en nuestros experimentos.

## RESULTADOS

Nuestros resultados los informaremos, en primer lugar analizando la fórmula roja y plaquetas de sangre periférica en hembras y machos. Posteriormente leucocitos y sus diferenciales y por último se analizará médula ósea.

En la tabla I se analizaron los datos de los ratones del sexo femenino, en esta se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de diferentes edades; no obstante, los animales de 11-16 semanas tienen el valor de Hb mas bajo y el de Ht mas alto con respecto de los animales de 8-10 semanas; las plaquetas son practicamente iguales en ambos grupos. En los animales de 11-16 semanas no se determinaron los glóbulos rojos.

En la tabla II se presentan los valores obtenidos de los parámetros ya citados de los ratones del sexo masculino, y se encontró que las cifras de Hb y plaquetas son mayores en el grupo de 11-16 semanas y el Ht es más bajo con respecto al grupo de 8-10 semanas. Sin embargo, ninguna de estas diferencias fué significativa estadísticamente.

En una comparación posterior de la formula roja y plaquetas entre los sexos se observó que tampoco había diferencias estadísticamente significativas en los parametros estudiados.

Todos los resultados de las tablas se expresan como promedio  $\pm$  desviación estandar y entre parentesis el número de casos estudiados. La significancia estadística de los datos se anotara al pie de cada tabla, así como el significado de la simbología utilizada.

TABLA I

## FORMULA ROJA Y PLAQUETAS DE SANGRE PERIFERICA DE RATON F' HEMBRA

	8-10 semanas	11-16 semanas
Glób. rojos $\times 10^6 / \mu l.$	$7.55 \pm 1.35$ (11)	-----
Hemoglobina g/100ml.	$15.28 \pm 1.26$ (14)	$14.36 \pm 1.21$ (5)
Hematocrito (%)	$46.93 \pm 2.76$ (14)	$49.00 \pm 1.20$ (5)
Plaquetas $\times 10^3 / \mu l.$	$1.26 \pm 0.35$ (14)	$1.27 \pm 0.12$ (5)

TABLA II

## FORMULA ROJA Y PLAQUETAS DE SANGRE PERIFERICA DE RATON F' MACHO

	8-10 semanas	11-16 semanas
Glób. rojos $\times 10^6 / \mu l.$	$5.93 \pm 1.76$ (11)	-----
Hemoglobina g/100 ml.	$14.80 \pm 0.70$ (11)	$15.22 \pm 0.68$ (10)
Hematocrito (%)	$48.82 \pm 1.08$ (11)	$47.30 \pm 1.42$ (10)
Plaquetas $\times 10^3 / \mu l.$	$1.11 \pm 0.12$ (11)	$1.34 \pm 0.66$ (10)

En las tablas III y IV se informan los resultados - del número total de leucocitos y sus correspondientes conteos diferenciales en sangre periférica de las diferentes edades.

Como se puede apreciar en la tabla III se presentan los datos de las hembras, en los cuales no se obtuvo ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de diferentes edades; sin embargo, en los machos (tabla IV) se encuentran diferencias en los leucocitos y en el valor absoluto de los linfocitos ( $p < 0.01$ ). Es por estas desigualdades - que no pudieron juntarse los valores de los ratones a diferentes edades.

Es importante hacer notar que los valores más altos - en las hembras están en el grupo de 11-16 semanas y en los machos en el grupo de 8-10 semanas.

Al realizar la comparación entre los sexos, se puede observar que sistemáticamente los machos de 8-10 semanas tienen conteos más altos que las hembras de la misma edad, existiendo diferencias significativas en el valor de los neutrófilos ( $p < 0.01$ ). En los ratones de 11-16 semanas, contrariamente al grupo anterior, las hembras presentan los valores mayores, habiendo diferencia significativa en el valor absoluto - de los linfocitos a nivel de ( $p < 0.01$ ) versus machos, en el resto de los conteos diferenciales no se apreciaron diferencias.



TABLA III

## LEUCOCITOS Y DIFERENCIALES DE SANGRE PERIFERICA DE HEMBRAS F'

	8-10 semanas	11-16 semanas
Leucocitos $\times 10^3/\mu\text{l.}$	4960 $\pm$ 1790 (14)	6190 $\pm$ 1000 (5)
Neutrófilos	804 $\pm$ 370	1021 $\pm$ 329
Linfocitos	3970 $\pm$ 1480	4947 $\pm$ 826
Eosinófilos	40 $\pm$ 30	39 $\pm$ 27
Monocitos	120 $\pm$ 80	181 $\pm$ 73

Los resultados de los conteos diferenciales se informan como cantidades totales  $/\mu\text{l.}$  de sangre periférica.

TABLA IV

## LEUCOCITOS Y DIFERENCIALES DE SANGRE PERIFERICA DE MACHOS NORMALES

	8-10 semanas	11-16 semanas
Leucocitos $\times 10^3/\mu\text{l.}$	6350 $\pm$ 1680 <sup>o</sup> (11)	4170 $\pm$ 1430 (10)
Neutrófilos	1210 $\pm$ 430	933 $\pm$ 364
Linfocitos	4902 $\pm$ 1378	3006 $\pm$ 1025
Eosinófilos	65 $\pm$ 27	60 $\pm$ 33
Monocitos	202 $\pm$ 101	143 $\pm$ 72

Los resultados de los conteos diferenciales se informan como cantidades totales  $/\mu\text{l.}$  de sangre periférica.

<sup>o</sup>  $p < 0.01$  en comparación con los machos de 11-16 semanas.

Por lo que respecta al número total de células nucleadas de médula ósea se compararon primeramente el lado izquierdo contra el lado derecho en hembras y machos de la misma edad y no se obtuvieron diferencias significativas estadísticamente; por lo que se decidió unir los valores de ambos lados y hacer la comparación posterior entre los grupos de diferentes edades y sexos, tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas como se puede apreciar en la tabla V.

TABLA V  
TOTAL DE CELULAS NUCLEADAS DE MEDULA OSEA

	( $\times 10^6$ cél./hueso) ♀	( $\times 10^6$ cél./hueso) ♂
8-10 s	$7.80 \pm 2.42$ (28)	$9.73 \pm 2.83$ (20)
11-16 s	$8.94 \pm 1.41$ (10)	$9.48 \pm 2.51$ (20)

s = semanas

En la tabla VI se presentan los resultados de los conteos diferenciales de médula ósea de las hembras, donde se puede observar que en la mayoría de los casos, los valores más altos corresponden a los animales de 11-16 semanas habiendo diferencias significativas solo en los neutrófilos en banda ( $p < 0.01$ ). Sin embargo, en los ratones del sexo masculino (tabla VII) no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa. Cuando se hizo la comparación de las diferenciales entre los sexos en los ratones de 8-10 semanas, se observó diferencia significativa en los valores de la serie granulocítica ( $p < 0.01$ ), estas desigualdades corresponden a los mieloblastos, promielocitos, mielocitos, neutrófilos en banda y eosinófilos, encontrando los datos mas altos en los machos. Por lo que corresponde a los ratones de 11-16 semanas no se observó diferencia estadísticamente significativa entre los sexos.

En los cortes histológicos de todos los huesos se observó un remanente de médula ósea, el cual se encuentra únicamente en las epífisis, la presencia de este remanente fue constante en todas las tibias pese a los lavados que se le hicieron a la cavidad medular.

TABLA VI  
 RESULTADOS DE LOS CONTEOS DIFERENCIALES DE MEDULA OSEA DE RATON F' NORMAL EN HEMBRAS

	8-10 s (28)	11-16 H (10)
Mieloblastos	139 ± 60	137 ± 34
Promielocitos	160 ± 66	173 ± 58
Mielocitos	342 ± 123	438 ± 123
Metamielocitos	379 ± 147	469 ± 133
Neutrófilos en banda	1004 ± 454**	1519 ± 340
Neutrófilos segmentados	23 ± 24	18 ± 18
Eosinófilos	317 ± 136	286 ± 79
Serie roja	1915 ± 547	2101 ± 453
Linfocitos	2381 ± 877	2630 ± 779
Células plasmáticas	19 ± 18	21 ± 12
Céls. Reticulo- endoteliales	163 ± 84	150 ± 43
Megacariocitos	5 ± 8	8 ± 16
Mitosis	13 ± 15	19 ± 21
Céls. no identificadas	938 ± 484	968 ± 196

Los valores se expresan como total de células por tibia

\*\*  $p < 0.01$  en comparación con las hembras de 11-16 semanas.

TABLA VII  
 RESULTADOS DE LOS CONTEOS DIFERENCIALES DE MEDULA OSEA DE RATON F' NORMAL EN MACHOS

	8-10 s (22)	11-16 s (20)
Mieloblastos	223 + 86**	175 <sup>±</sup> + 86
Promielocitos	248 + 120**	187 + 78
Mielocitos	515 ± 248**	465 ± 145
Metamielocitos	438 + 244	440 ± 160
Neutrófilos en banda	1608 ± 680**	1606 ± 507
Neutrófilos segmentados	27 ± 24	24 ± 21
Eosinófilos	211 ± 90**	319 ± 159
Serie roja	2249 + 674	2078 ± 593
Linfocitos	2874 ± 815	3117 ± 847
Células plasmáticas	22 ± 42	21 ± 12
Céls. reticulo- endoteliales	241 ± 110	208 ± 137
Megacariocitos	5 ± 11	3 ± 7
Mitosis	17 ± 25	14 ± 16
Céls. no identificadas	971 ± 466	989 ± 357

Los valores se expresan como cantidad total de células por tibia.

\*\*  $p < 0.01$  en comparación con las hembras de 8-10 semanas.

## DISCUSION

Al caracterizar una población "normal" es necesario definir que se entiende como normalidad. Sobre este aspecto varios investigadores han tratado de establecer un concepto con todas las variables involucradas en una población y que a la vez sirva como base para la comparación con procesos patológicos y experimentales. Para ello se han propuesto varias definiciones, algunas de las cuales mencionaremos brevemente:

Para unos autores normal significa la condición del organismo en su estado natural (10)., pero este concepto no considera factores tales como enfermedades endémicas. Mientras que otros autores definen normal en un sentido estadísti

co limitado, "Curva de Gauss" o de campana, esta definición no toma en cuenta los factores biológicos, ni las variables cuantitativas tan frecuentes en la Biología (7). Amador E. modifica la definición de Linus Pauling sobre la definición-fisicoquímica de normal y propone el siguiente concepto: "El estado normal de un sistema biológico es aquel de entre todos los estados concebibles en el cual la composición, estructura y función de sus partes le proveen al organismo salud, bienestar y longevidad" (2).

Esta última definición consideramos que es una de las más adecuadas ya que se ve afectada por los atributos cuantitativos y cualitativos de todo sistema viviente. Como se ve esto enfatiza la dificultad en establecer un grupo representativo aún dentro de una población "normal" puesto que este grupo se verá influenciado por variables tales como la edad, el sexo, medio ambiente, etc. Factores todos ellos de gran importancia por lo cual trataremos con mayor amplitud a continuación aquellos que pensamos son más relevantes para el establecimiento de los valores normales en los parámetros hematológicos estudiados.

Así tenemos que Kameacff en 1937 (16) reportó diferencias de sexo en cuatro cepas de ratones a las que les determinó el número de glóbulos rojos. También Rugh y Somogyi (30), en ratones de la cepa CFl encontraron diferencias entre hembras y machos en los conteos de glóbulos rojos, Hb, leucocitos y plaquetas. Por nuestra parte encontramos diferencias

estadísticamente significativas entre los sexos en leucocitos, neutrofilos y linfocitos así como en las diferenciales de médula ósea sobre serie granulocítica. Estos resultados se pueden explicar por las diferencias hormonales entre hembras y machos, -- pues se ha demostrado que los andrógenos tienen efecto estimulador sobre el tejido hematopoyético (17).

Con respecto a la edad, en un estudio donde se compararon los conteos de sangre de ratones pre y postnatales hasta de 9 semanas, (30) se encontró que había diferencias en las plaquetas, glóbulos rojos, linfocitos y neutrófilos, sin embargo, en los ratones que trabajamos solo se observaron diferencias significativas en leucocitos y linfocitos entre los grupos de 8-10 semanas y el de 11-16 semanas. Esto posiblemente se deba a que los ratones de ambos grupos se encontraban en edad adulta, lo que implica que no hubiera importantes cambios funcionales o de crecimiento (31). Solo se trabajaron estos dos grupos de edades, debido a que los ratones de menor edad son más difíciles de sangrar por nuestro sistema -- además que tienen los huesos muy pequeños, lo que dificulta el lavado de la cavidad medular, al contrario de los ratones de mayor edad que tienen los huesos muy calcificados de tal manera que se rompen con facilidad provocando errores en los conteos de médula ósea.

En referencia al tipo de ratón usado, varios investigadores han tratado de establecer si existen variaciones hematológicas entre cepas de ratón, por lo que han comparado los



resultados de las cepas mas utilizadas en los proyectos de investigación (16, 22 bis, 31), ver cuadro I, observándose que aunque no siempre hay diferencias estadísticas, cada cepa tiene su valor típico para cada determinación. Por lo que corresponde al valor de las determinaciones de la cepa del ratón con que trabajamos (♀ BALB/c y ♂ DBA/2)<sub>F1</sub>, observamos que respecto de otras, los conteos de glóbulos rojos y leucocitos tienen valores bajos a diferencia de la Hb y Ht que tienden a presentar valores elevados y los resultados de las diferenciales de sangre periférica caen en la parte media del rango. -- Estas diferencias seguramente se deben a las características genéticas de cada cepa y a variantes en la metodología empleada.

Por lo que respecta a la metodología es un factor -- crítico en las determinaciones pues es necesario conocer la -- precisión y error de cada método utilizado. Los problemas -- técnicos son probablemente la fuente más importante de error -- por lo que también comentaremos brevemente los que consideramos mas relevantes para la obtención de valores dentro de los límites de confiabilidad.

Para comenzar se requiere de un anticoagulante adecuado; los anticoagulantes mas utilizados en hematología son el EDTA, la mezcla de oxalato de amonio y sodio y la heparina; hecho que no implica que sean perfectos, todos ellos tienen sus limitaciones. Por ejemplo un exceso de EDTA ( 2 mg/ml de sangre) resulta en una disminución significativa del --

## CUADRO I

## VALORES HEMATOLOGICOS DE DIFERENTES CEPAS DE RATON NORMAL

Cepa	Hg	Ht	GR	Leucoci tos	Linfo	Mono	Eo.
	g/100ml	%	/ $\mu$ l	/ $\mu$ l	Abs	Abs	Abs
C57B1/6xA <sub>2</sub> G	14.8	43	8.6	4.5	3500	80	40
Charles River	11.9	41	7.9	7.3	—	—	—
C57B1/6Jex	16.2	48	10.0	—	—	—	—
Strein CBA	15.4	—	9.0	12.8	9600	—	—
C57 B1	12.7	42	7.4	9.4	8300	160	20
(BALB) <sub>c</sub> y DBA/2) <sub>F</sub> 1	14.8	48	5.9	5.5	4500	170	60

paquete celular. Otras desventajas del EDTA y la mezcla de oxalatos son que afectan el contenido enzimático y la morfología de las células sanguíneas (9, 18, 26); estos cambios ocurren más rápidamente en la sangre con oxalato que en la que tiene EDTA, esto parece ser proporcional a la concentración del anticoagulante. La principal ventaja del EDTA sobre el oxalato es que previene la aglutinación de las plaquetas "in vitro" y por lo consiguiente permite un conteo más seguro de las plaquetas.

Otro anticoagulante de uso generalizado es la heparina, que no afecta el tamaño de los glóbulos rojos y reduce la posibilidad de hemólisis al mínimo, pero los principales inconvenientes de la sangre heparinizada son el de que no es recomendable para morfología por producir un fondo azul en los frotis (19) y que no evita por completo la aglutinación de las plaquetas, por lo que no es adecuado para el conteo de las mismas.

Considerando los factores ya citados, se escogió el EDTA como anticoagulante; no obstante siempre hay que tomar en cuenta estos inconvenientes ya que esto podría hacer variar las determinaciones sobre todo por el hecho de que no siempre es posible obtener 0.5 ml. de sangre de un ratón, volumen calculado para la cantidad de anticoagulante que queda en la jeringa impregnada.

Por lo que se refiere al sitio de toma, nosotros hemos sistematizado las determinaciones para sangre obtenida

de la vena cava inferior principalmente porque es un sitio - de fácil acceso, a la vez que es un vaso del que se puede tomar la sangre con jeringa y aguja, con lo que se obtiene un - volumen suficiente para hacer todas las determinaciones del - perfil hematológico, pero sobre todo los conteos son regula- res y reproducibles. El principal inconveniente es que no es posible repetir las determinaciones en el mismo animal.

Para el conteo de eritrocitos se tiene un gran error debido a las diluciones seriadas que se realizan; de ahí el - valor de la desviación estandar tan elevado. Sin embargo, la determinación con el contador electrónico es mejor que el con- teo en el hemocítometro, en el que además del error propio de la dilución, esta el error del observador. (33)

El método utilizado para la determinación de la Hb - es el mas aceptable ya que la cianometahemoglobina es el mas- estable de los derivados de la hemoglobina que tiene propieda des de absorción de luz visible, por lo que su lectura se fa- cilita en un espectrofotómetro obteniendo un error del orden de  $\pm 0.5\%$ , lo que le proporciona alta confiabilidad (36).

Para el Ht, el método de microhematócrito se selec- cionó debido a que se requiere un volumen pequeño de sangre, - corto tiempo para llevarlo a cabo y a que sus resultados son- altamente reproducibles (24). Además de que el valor del Ht- no se ve afectado por el tipo de sangre, capilar o venosa.

Por lo que corresponde al método de las plaquetas se ha encontrado que el de Brecher (4) es uno de los mas seguros

ya que la dilución limitada reduce el error estadístico.

Para el conteo de leucocitos se considera que el procedimiento empleado es uno de los más seguros, dado que la dilución se efectuó con un aparato diluctor automático que tiene un error de  $\pm 1\%$  (22) además, de que la muestra se contó - mínimo por duplicado en el Coulter Counter, el cual tiene un coeficiente de variación de  $\pm 4\%$  (33) a diferencia del hemocitómetro que tiene un coeficiente de variación mínimo de  $\pm 16\%$  (33). Los inconvenientes de este procedimiento son - principalmente que se requiere de filtrar, en ocasiones, el diluyente por Millipore y que es necesario que los aparatos - esten muy bien calibrados, para que el conteo sea real.

Para la determinación del total de células de médula ósea, diversos investigadores han modificado y tratado de perfeccionar un método; el que nosotros utilizamos está basado - en el que reporta Chevernick en 1968 (8), este procedimiento - se eligió por ser reproducible y por ser el método por el - cual se obtiene la mayor cantidad de médula ósea sin destruir - la, de cualquier modo cuenta con inconvenientes como el del - lavado de la cavidad medular que no es completo, lo cual se - ratificó en los cortes histológicos donde las epífisis mues- - tran un remanente más o menos constante de médula ósea que co - rresponde seguramente a la cantidad de  $Fe^{++}$  radioactivo rema- - nente en el hueso como lo reportó el autor mencionado. Noso- - tros encontramos que había mayor reproducibilidad en el con- - tenido total de células de médula ósea en la tibia y el húme-

ro que en el fémur; sin embargo a causa de que el húmero es - un hueso difícil de disectar así como de lavar su cavidad medular y porque encontramos diferencias en las cantidades relativas de las células que lo componen, nosotros usamos a la tibia como hueso para llevar a cabo los estudios hematopoyéticos.

Con respecto a los conteos diferenciales de sangre - periférica y de médula ósea se considera al procedimiento usado como uno de los más adecuados tanto por la manera de hacer el frotis como por el número de células contadas en cada frotis.

Existen reportados como causa de diferencias en las determinaciones hematológicas otros factores tales como la actividad física o emocional, el peso, la postura del sujeto a estudiar así como la hora del día, la estación o la altitud, etc. (20) ninguno de los cuales estudiamos ya que los animales se encontraban bajo condiciones experimentales de laboratorio donde todos estos factores son controlados hasta donde es posible. Sin embargo, como se puede notar por el presente trabajo es una necesidad para cada laboratorio de la determinación de sus valores propios de acuerdo sino a todos los factores que se mencionaron sí por lo menos a la mayoría de ellos (11) ya que de otra manera se corre el peligro de obtener resultados poco confiables.

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se realizó el estudio hematológico de ratones normales híbridos F' (♀ BALB/c y ♂ DBA/2) los que se dividieron en hembras y machos de diferentes edades, de 8-10 semanas y de 11-16 semanas. A estos animales se les determinó glóbulos rojos, Ht, Hb, plaquetas, leucocitos, total de células nucleadas de médula ósea, así como conteos diferenciales de sangre periférica y de médula ósea, utilizando para el estudio del tejido mieloide, la tibia.

Se encontraron diferencias significativas entre los sexos en la mayoría de las determinaciones, principalmente en las que corresponden a médula ósea y sus diferenciales. Con respecto a la edad, las diferencias son mínimas.

Se concluyó que el examen hematológico es una de las principales herramientas de estudio tanto clínicas como experimentales, por lo que cada laboratorio debe tener una tabla de valores normales de cada especie que se trabaje, en la cual especifiquen las variaciones que se puede presentar a causa de factores como el sexo, la edad, la cepa, etc. al igual que un método bien establecido para cada determinación del cual se conozcan sus límites y ventajas. Todo esto es de gran importancia ya que sirve como base de comparación en estudios posteriores.

## ADDENDUM ESTADISTICO

## 1. Promedio

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{N}$$

## 2. Desviación estandar

$$D.E. = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N}}$$

## 3. "t" de student para promedios de muestras independientes.

$$"t" = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(N_1 - 1) S_1^2 + (N_2 - 1) S_2^2}{N_1 + N_2 - 2} \left( \frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}}$$



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Amador E. 1973. Normal Ranges. En : M. Steffani Eds. Progress Clinical Pathology, Grunne & Stratton. New York Vol. 5 pp: 59 - 83.
2. Amador E. 1975. El concepto de normalidad. Patología. 13: 9 - 15.
3. Boggs D.R., P.A. Chevernick. J.C. Marsh, H.I. Pilgrim, - G.E. Cartwright y M.M. Wintrobe. 1967. Granulocytopoiesis in germfree mice. Proc. Soc. Expo. Biol. Med. 125 : 325 - 330.
4. Brecher G. y E. Cronkite. 1950. Morphology and enumeration of human blood plateletes. J. Appl. Physiol. 1 : 365-377.
5. Brittin G.M. y G. Brecher. 1971. Instrumentation and automation in clinical hematology. En: Progress in Hematology E. Brown y C.V. Moore Eds. Grunne & Statton. New York. - pp: 299 Vol. VII.
6. Cartwright G.E. 1968. Diagnostic Laboratory Hematology. - 4 ed. Grunne & Stratton. New York.
7. Cochran W.G. y G.M. Cox. 1980. Dibujos experimentales. - Editorial Trillas. México.
8. Chevernick P. et al. 1968. Quantitative studies of blood- and bone marrow neutrophils in mice. Am. J. Physiol. 215- 353-360.

9. Dacie J.V. y S.M. Lawin. 1968. Practical hematology. 4 - ed. Churchill. Londres. pp: 6.
10. Diccionario Porrúa de la Lengua Española, 1970. Editorial Porrúa. México.
11. Dunn T.B. 1954. Normal and pathologic anatomy of the reticular tissue in laboratory mice, with a classification and discussion of neoplasms. J. Nat. Cancer Inst. 14 : 1281 - 1390.
12. Chan Po-Chuen, et al. 1966. Quantitative of mouse femoral and tibial marrow using an electronic cell counter. Proc. Soc. Esp. Biol. Med. 121 : 793 - 795.
13. Fruhman G.J. y A.S. Gordon. 1955. Quantitative effect of cortiscosterone on rat bone marrow. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 88 : 130 - 131.
14. Ham A. 1976. Tratado de Histología 7a. ed. Editorial Interamericana. México. pp: 279-302.
15. Hulse E.V. 1964. Quantitative cells counts of the bone marrow and blood and their secular variations in the normal adult rat. Acta Haematol. 31 : 50-63.
16. Kamenoff R.J. 1973. Erythrocyte count in four inbred strains in mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 36 : 411-414.
17. Kennedy B.J. 1962. Stimulation of erythropoiesis by androgenic hormones. Ann. Int. Med. 57 : 917-935.
18. Lampasso J.A. 1965. Error in hematocrit value produced by excessive EDTA. Amer. J. Clin. Path. 44: 109-110.

19. Lewis B.S.M. 1970. Blood collection and preservation - haematological analyses. En: Astaldi G. Sirtori C. y G. - Vanzetti. Eds. Standarization in Hematology. Fondazione - Carlo Erba. Franco Angeli Editore. Milan Italia. pp: 154-161.
20. Lewis S.M. 1970. Normal hemoglobin values versus observed-values: problems of establishing the normal haemoglobin - values in a community. En: Astaldi G. Sirtori C. y G. - Vanzetti. Eds. Standarization in Hematology. Fondazione - Carlo Erba. Franco Angeli Editore. Milan Italia. pp: - 92-101.
21. Lo Bue J. et al. 1963. A technique for estimating mouse - femoral marrow cellularity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 112 : 385.
22. Manual de Instrucción del Fisher Modelo 241 Dilumat Diluter de Fisher Scientific Co. Pittsburg Pennsylvania.
- 22bis. Melby E.C. y Altunes N.H. 1976 Handbook of laboratory-animal science Vol. III. CRC Press, Inc. pp. 448-450.
23. Metcalf D. y M.A.S. Moore. 1971. Haematopoietic cells. - Frontiers of Biology. Vol. 24 North - Holland Publishing-Col.
24. Mc Govern J.J. et al. 1955. The hematocrit of capillary - blood New J. Engl. Med. 253 : 308 - 312.
25. Mc Inroy R.A. 1954. A micro - hematocrit for determining - the packed cell volume and haemoglobin concentration on - capillary blood. J. Clin. Pathol. 7 : 32-34.

26. Pennock C.A. y K.W. Jones. 1966. Effect of EDTA (dipotassium salt) and heparin on the estimation of packed cell-volume. J. Clin. Path. 19 : 196-199.
27. Quesenberry P: y L. Levitt. 1979. Hematopoietic stem cells. New Engl. J. Med. 301 : 755-760.
28. Ibid. New Engl. J. Med. 301 : 819-823.
29. Ibid. New Engl. J. Med. 301 : 869-872.
30. Rugh R. y Somogyi C. 1968. Pre and Postnatal normal blood mouse cell counts. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127 : 1267-1272.
31. Rusell E.S. et al. 1951. Comparison of normal blood picture of young adults from 18 inbred strains of mice. Proc. Soc. Expo. Biol. Med. 78 : 761-766.
32. Snedecor G.W. y Cochran W.G. 1971. Métodos Estadísticos - C.E.C.S.A. México. pp: 170-190.
33. Wintrobe M.M. et al. 1974. Clinical Hematology. 7a. ed. - Lea & Febiger. Philadelphia U.S.A. pp: 20-241.
34. Worton R.C. et al. 1969. Physical separation of hematopoietic stem cells from cells forming colonies in culture. J. Cell. Physiol. 74 : 171-182.
35. Yoffey J.M. 1980. Transitional cells of haematopoietic tissues: Origin, structure and developmental potential. - Inter. Rev. Cytol. 62 : 311-359.

36. Ziljstra W.G. et al. 1970. Standarization of Haemoglobi--  
nometry: Establishing the refernce point. En: Astaldi G.-  
Sirtori C. y G. Vanzetti. Eds. Standarization in Hematolo  
gy. Fondazione Carlo Erba. Franco Angeli Editore. Milan -  
Italia. pp: 73-80.