



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ALTERACIONES HEMATOLOGICAS
EXPERIMENTALES EN RATAS
POR LA ACCION DEL BENCENO**

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

MARIA CRISTINA LOPEZ AVILEZ

MEXICO, D. F.

1981



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

I N T R O D U C C I O N

La anemia aplásica en el hombre es una enfermedad en la que destacan: pancitopenia periférica, imagen de aplasia en la médula ósea, y generalmente ausencia de crecimientos ganglionares y viscerales. Es oportuno señalar que también se utiliza el término de anemia refractaria en aquellos casos que representan pancitopenia en sangre periférica, y la médula ósea revela grados variables de celularidad.

La anemia aplásica predomina claramente en la edad escolar, y su incidencia disminuye en preescolares y adolescentes (1). La importancia del cuadro hematológico en cuestión radica en el pronóstico sombrío que acompaña a un número importante de estos pacientes (1).

En la identificación de su etiología, se apreció que puede obedecer a varias causas, no establecidas en todos los casos. Así, corresponde mencionar a los agentes químicos y físicos que pueden inducir pancitopenia periférica y aplasia. Estos hechos determinaron la elaboración del presente trabajo, en procura de definir la relación entre un agente químico, en este caso el benceno, y la producción de aplasia medular en animales de experimentación.

En una encuesta llevada a cabo por Dorantes (2) en varias instituciones pediátricas de México y de algunos países latinoamericanos, llamó poderosamente la atención el hecho de que mientras en nuestro país los casos de anemia aplásica correspondían a uno de cada mil egresos o ingresos hospitalarios, con estancia superior a 48 hrs, en Argentina y Chile representaban sólo alrededor de uno por dos mil egresos, encontrando cifras aún más bajas de frecuencia en Costa Rica: 0.12 por 1000 egresos (2). Estas diferencias constituyen otra motivación para la planificación de estudios que procuren identificar mecanismos patogénicos de este padecimiento.

Cuando se piensa que de un gran número de niños expuestos a cantidades semejantes de cloranfenicol, diversos insecticidas, adelgazadores de pinturas y --

otras sustancias, sólo un porcentaje mínimo desarrolla aplasia de la médula ósea, tiene que plantearse la existencia de una condición agregada en estos pacientes, que determine una reacción diferente a éstas sustancias (3).

Esta situación podría estar representada por el estado nutricional, ya -- que es muy llamativo el hecho de que en un estudio que realizaron Dorantes, Vega, Ajuria, De Los Cobos, Villaseñor y Solorzano (4) se encontró que estos pacientes presentaban generalmente una talla igual o inferior al 95% del correspondiente a niños de su edad, y de treinta y un niños, dieciocho tenían un peso igual o inferior al 90% del correspondiente a su edad. Además, se -- trataba de niños con cocientes intelectuales bajos. Un número significativo -- procedía de un hogar que no estaba integrado y que tenía un ingreso mensual inferior a los trescientos pesos mexicanos; aunque es cierto que la incidencia de retraso en el crecimiento y desnutrición en los niños con anemia a -- plástica podría explicarse simplemente por la elevada prevalencia de estas -- condiciones en pacientes que ingresan al Hospital Infantil de México.

Con el fin de valorar a la nutrición en la genesis de la anemia aplástica se decidió estudiar la posible acción sinérgica de la desnutrición inadecuada y de un factor tóxico.

Al haberse descrito la producción experimental de aplasia medular mediante el benceno, se consideró factible producir la enfermedad en ratas en crecimiento y explorar la relación: crecimiento - nutrición - acción de un tóxico, y la producción de aplasia de la médula ósea.

Los estudios de Santesson en 1897 (5) mostraron la correlación entre la intensidad y duración de la exposición al benceno, y el grado de supresión de -- la médula ósea.

Moeschlin y Speck (6) lograron provocar aplasia de médula ósea, mediante -- la aplicación subcutánea de benceno, a conejos. En su trabajo señalan que en-

los 27 animales a los que se administró dosis de 0,3 ml / kg. de peso, durante una a nueve semanas se demostró pancitopenia periférica y en 19 animales - en los que se practicó médula ósea, se detectaron cambios morfológicos con grandes variables de hipoplasia.

Este método se aplicó en el presente estudio en un grupo de ratas, y al observar que la absorción del tóxico no podía ser efectiva por la producción de nódulos de nódulos en el sitio de inyección, se conformó otro grupo sometido a inhalación del producto químico, mecanismo que ya fué invocado como productor de aplasia de médula ósea en sujetos expuestos a benceno, tolueno e insecticidas. El presente trabajo informa sobre los resultados obtenidos hasta la fecha, en la producción experimental de anemia refractaria mediante el empleo de benceno en ratas en crecimiento.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Se dispuso de un grupo de treinta y siete ratas blancas recién nacidas, procedentes de la granja de animales del Instituto Nacional de Cardiología, y correspondientes a la raza Wistar.

Se utilizó benceno químicamente puro que contenía un mililitro de benceno en 1.138 ml. de la solución.

El trabajo se realizó en dos etapas:

- (a) Administración de benceno por vía parenteral, a ratas recién nacidas.
- (b) Administración de benceno por métodos de inhalación a ratas de diferentes edades.
- (a) Administración del benceno por vía parenteral.-

Se utilizaron 37 ratas blancas recién nacidas, subdivididas en 5 grupos:

Grupo N°1: En este grupo se administró 0.150 ml/kg de peso, calculado como --

benceno puro por vía subcutánea. Como la cantidad por inyectar era muy pequeña, se preparó una dilución 1:100 que contenía:

- Solución de benceno al 87.87% 1 ml.
- Alcohol absoluto 40 ml.
- Cloruro de sodio al 0.9% 59 ml.

A tres de las siete ratas del grupo, se les inyectó una sola dosis a los siete días de edad, sacrificándolas al 14°, 21°, y 28°, días, respectivamente.

A otras tres ratas se les inyectó a los 7 y 14 días, y se sacrificaron al 21°, 28°, y 35°, días.

A una rata se le inyectó a los 7, 14 y 21 días, y se sacrificó a los 35 días de edad. La octava rata falleció a los once días de edad, sin causa establecida.

Grupo N° 2.- Como en el primer grupo se apreció necrosis cutánea de grado variable en el sitio de inyección, se logró obtener una dilución de benceno con menor volumen de alcohol absoluto, dilución que contenía:

- Solución de benceno al 87.87% 1 ml.
- Alcohol absoluto 10 ml.
- Cloruro de sodio al 0.9 % 89 ml.

La dosis fue de 0.150 ml / kg. de peso, como benceno puro. A tres de las ocho ratas de este grupo se les aplicó una sola dosis a los 7 días de edad y fueron sacrificadas al 14°, 35°, y 42°, días, respectivamente.

A tres ratas se les aplicó una dosis a los 7 días y otra a los 14 días de edad, y fueron sacrificadas al 35°, 42°, y 56°, días.

Dos ratas recibieron tres inyecciones al 7°, 14°, y 21°, días, siendo sacrificadas al 42°, y 56°, días.

Grupo N° 3.- Se les aplicó 0.150 ml / kg. de peso, de benceno puro sin diluir. De siete ratas, dos recibieron tres dosis de benceno la segunda semana de vida, y fueron sacrificadas al 21°, y 28°, días.

Tres ratas recibieron tres dosis de benceno la segunda semana, y tres dosis-

la tercera semana, y fueron sacrificadas al 28%, 35%, y 42%, días de edad respectivamente.

Una rata recibió tres dosis de benceno la segunda semana de vida, otras tres en la tercera y tres dosis en la cuarta semana, sacrificándose a los 42 días de edad.

Una rata control no recibió benceno y fué sacrificada a los cuarenta y dos días de edad.

Grupo N° 4.- Este grupo estuvo formado por siete ratas y sometido al mismo esquema de administración que el tercer grupo, con la diferencia de que se duplicó cada dosis a razón de 0.300 ml / kg. de peso, calculado como benceno puro. Tres ratas de este grupo fallecieron bruscamente después de la cuarta dosis, y durante la tercera semana de vida.

Una rata se sacrificó en la tercera semana, y otras dos en la cuarta semana. Se dispuso igualmente de otra rata control que no recibió benceno.

Grupo N° 5.- Conformado por siete ratas, que se sometieron al mismo esquema de dosis y sacrificio que el tercer grupo, pero recibieron dosis de 0.300 ml / kg. de peso.

A todos los integrantes de estos grupos, inmediatamente antes del sacrificio se les tomaba muestra de sangre seccionando la cola, y se determinaba por duplicado: hemoglobina, hematocrito, recuento de reticulocitos, cifra total de leucocitos y fórmula diferencial, así como recuento de plaquetas.

A continuación se sacrificaban mediante la inhalación de éter, practicando revisión macroscópica de los órganos, y tomando una muestra de fémur, de la cual se hacían preparaciones para el estudio de la médula ósea.

(b) Administración del benceno por método de inhalación.-

Se intentó la inhalación de una cantidad controlada de benceno en diez ratas de cuatro semanas a siete meses de edad. Con este fin, se diseñó una-

cámara de plástico transparente herméticamente cerrada, en donde se depositaban los animales de estudio, para su observación.

La cámara de plástico tenía 23 cm. de ancho, 23 cm. de largo, 10 cm. de altura y estaba provista de una tapa con ajuste satisfactorio, y con una subdivisión que permitía depositar cal sodada en el fondo de la cámara (figura N.º 1). A una de las paredes laterales de dicha cámara se conectó un tubo de vidrio, el cuál tenía un pequeño recipiente en su parte media, en el que se depositaba el benceno; en el otro extremo del tubo se conectó un balón de hule distensible, que se llenaba de aire como única fuente de oxígeno para el animal. Se comprobó que el dispositivo era hermético, mediante su inmersión en agua.

Se emplearon tres grupos de ratas:

El primer grupo constituido por cuatro ratas siendo una de ellas de siete meses de edad y tres ratas en crecimiento, con cinco semanas de edad.

El segundo y tercer grupo estuvo constituido por tres ratas en crecimiento, de 4 a 5 meses de edad.

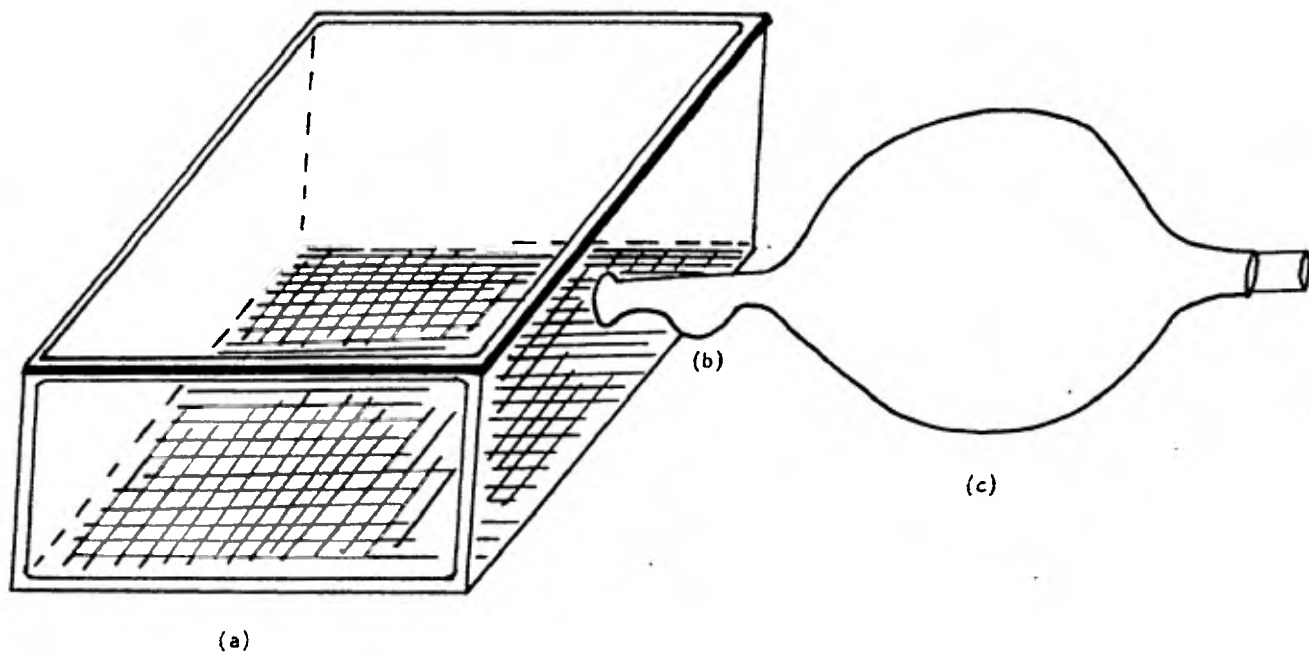
El primer grupo se le sometió a inhalación diaria de benceno en cantidad de 0.150 ml / kg de peso, durante treinta minutos por un periodo de diez a veintisiete semanas.

Las ratas del segundo grupo inhalaban diariamente el benceno, en cantidad de 0.00 ml / kg de peso, durante treinta minutos, por un periodo de trece a catorce semanas.

El tercer grupo inhaló benceno, diariamente, a dosis de 0.450 ml / kg de peso durante treinta minutos, por un periodo de seis a doce semanas.

El cálculo de dosis de benceno puro, se realizó en forma individual, tomando la referencia del peso del animal, lo que se pormenoriza en la Tabla N.º 1.

FIGURA N.º 1



- (a) .- Cámara de plástico
(b) .- Recipiente para el benceno
(c) .- Balón de hule distensible.

T A B L A N.º 1 - Dosis de benceno calculada en forma individual

RATA	Peso (Kgs.)	Edad (semanas)	Dosis inicial de benceno en ml.	Tiempo de exposición (semanas)
1	0.480	31	0.083	10
2	0.167	5	0.028	13
3	0.158	5	0.027	27
4	0.066	5	0.011	26
5	0.256	5	0.089	13
6	0.280	3	0.089	14
7	0.248	3	0.086	14
8	0.272	4	0.141	12
9	0.301	3	0.156	6
10	0.261	3	0.135	12

Estas dosis se modificaron en la misma proporción de acuerdo con el incremento de peso.

Se observó que la evaporación del benceno ocurría en un período de diez minutos pero la permanencia del animal en la caja se extendió hasta los 30 minutos. En todas las ratas se observó cianosis y polipnea, al concluir el período de inhalación del benceno, y estas manifestaciones fueron más intensas en la rata N.º 1, que además presentó datos de: Incoordinación e inquietud buscando una vía de salida.

Los datos anteriores nos hicieron pensar que no hubiese un intercambio gaseoso adecuado entre los pulmones del animal y el aire de la bolsa de hule, por lo cual se decidió practicar determinación de presiones parciales de oxígeno y de CO₂ en sangre extraída por punción directa del corazón, antes y

después de la inhalación de benceno.

A todas las ratas del estudio se practicó, una vez por semana y por duplicado las pruebas siguientes: hemoglobina, hematocrito, cifra total de leucocitos y fórmula diferencial, así como recuento de plaquetas.

Se practicó autopsia en aquellas ratas que fallecieron durante el estudio.

Para evaluar los resultados obtenidos se dispuso de las tablas de valores normales apropiadas, de acuerdo a la publicación de Albritton (7), y que corresponde al siguiente cuadro.

CUADRO N° 1 - Valores sanguíneos normales en ratas
(Sangre periférica Albritton)

- Hemoglobina (1 a 7 días de edad)	8.3 (6.3- 10.5	g/100 ml.
(8 a 14 días de edad)	6.6 (4.6 - 9.0)	g/100 ml.
(más de 14 días de edad)	12.8	g/100 ml.
- Leucocitos	5.000 - 25.000	/ mm ³
- Neutrofilos	1.100 - 6.000	/ mm ³
- Eosinofios	0 - 700	/ mm ³
- Linfocitos	7.000 - 16.000	/ mm ³
- Plaquetas	232.000 - 641.000	/ mm ³
- Reticulocitos	0.6 - 4.9	%

RESULTADOS

1.- Resultados obtenidos con la administración subcutánea de benceno.

Grupo N° 1.- (Cuadro 2 y 3) Las cifras de hemoglobina (Hb) se hallaron disminuidas solamente en las ratas # 3 y 5, y los leucocitos dentro de límites normales, con cuenta diferencial normal. Todas las ratas presentaron reticulocitosis de grado variable y sólo la rata # 7 presentó plaquetopenia.

Sin embargo, no se observó depresión de la médula ósea en ninguna de las ocho ratas. Todas, excepto la rata # 2, presentaron necrosis en el sitio de la inyección de benceno. En dos de las ratas (# 2 y 6) se observó hemorragia pulmonar petequiral leve.

CUADRO N° 2.- Grupo 1: Hallazgos hematológicos en las ocho ratas.

RATA	Hb g./100 ml.	Reticu- locitos mm ³	Leucoci- tos mm ³	Neutrofi- los tota- les mm ³	Plaquetas mm ³
1	-	-	-	-	-
2	10.6	17	5,570	2,172	320,000
3	10.9	-	8,140	2,988	-
4	10.5	18.8	14,540	11,050	445,000
5	11.9	11.6	7,050	2,541	755,000
6	12.1	9.0	8,550	1,905	290,000
7	13.2	10.0	11,780	2,075	55,000
8	12.6	9.5	1,040	3,129	370,000

CUADRO N° 3 .- Resultados de los estudios de médula ósea y de las necropsias practicadas en las ocho ratas del grupo 1.

RATA	Celularidad (+)	Megacariocitos (+)	Neutrófilos totales %	Neutrófilos jóvenes totales %	Celulas plasmáticas %	Necropsia
1	++	++	52	43	-	-
2	+++	++	56	25	-	H.P. (*)
3	+++	+++	40	27	-	-
4	+++	++	23	12	-	-
5	+++	+++	30	20	-	-
6	+++	++	17	12	-	-
7	+++	Normales	14.5	16	-	-
8	+++	+++	34	20	-	H.P.

(+) Incremento estimado por cruces

(*) Hemorragia pulmonar.

Grupo N° 2 .- (Cuadros 4 y 5). Las cifras de hemoglobina se encontraron en límites normales en todas las ratas, al igual que los valores de leucocitos y las cuentas diferenciales; en cinco de siete ratas se observó reticulocitosis y plaquetopenia en dos de las ocho ratas (ratas # 1 y 7). En todos los animales la médula ósea fué normal, y en seis de ellos la autopsia demostró hemorragia pulmonar de tipo petequeal. En ninguna de las ratas de este grupo hubo necrosis en el sitio de la inyección del tóxico, observación que estuvo de acuerdo con el empleo de un volumen menor de alcohol absoluto.

C U A D R O N° 4 .- Hallazgos hematólogicos en las ocho ratas del grupo 2.

RATA	Hb g/100 ml.	Reticu- locitos mm ³	Leuco- citos mm ³	Neutrófi- los tota- les mm ³	Plaquetas mm ³
1	12.8	13.6	6,200	2,852	190,000
2	13.6	12.4	10,880	1,196	385,000
3	13.6	12.5	5,640	1,140	300,000
4	12.4	-	16,020	3,524	415,000
5	14.3	1.0	12,800	3,200	232,000
6	13.0	5.4	7,840	1,588	540,000
7	16.8	1.6	-	-	94,000
8	15.6	16.0	-	-	280,000

C U A D R O N° 5 .- Resultados de los estudios de médula ósea y de las necropsias practicadas en las ocho ratas del grupo 2.

RATA	Celula- ridad (+)	Megaca- rlocitos (+)	Neutrófi- los madu- ros tota- les %	Neutrófi- los jov- nes tota- les %	Celulas plasmá- ticas %	Necropsia
1	++	Normales	18	11	-	H.P. (*)
2	+++	+++	31	14	-	-
3	+++	+++	61	42	-	-
4	+++	++	19	21	-	H.P.
5	+++	+++	23	15	-	H.P.
6	+++	+++	34	27	-	H.P.
7	+++	+++	27	5	-	H.P.
8	+++	++	23	6	-	H.P.

(+) Incremento estimado por cruces

(*) Hemorragia pulmonar.

Grupo N° 3 .- (Cuadros 6 y 7). Las cifras de hemoglobina, leucocitos y cuenta diferencial se encontraron dentro de límites normales. Todas presentaron reticulocitosis y solo la rata # 1 presentó plaquetopenia. En la médula ósea se observó, celularidad aumentada, con megacariocitos presentes, sin observarse células plasmáticas. En la necropsia, todas las ratas inyectadas presentaron necrosis cutánea en el sitio de la inyección del benceno puro y en cuatro de ellas se observó hemorragia pulmonar leve.

Grupo N° 4 .- (Cuadros 8 y 9). Se obtuvieron datos de la sangre periférica en cuatro ratas, ya que tres de este grupo fallecieron antes de completar el estudio (ratas # 4, 5 y 6). Las cifras de hemoglobina se hallaron en límites normales en las cuatro ratas; la rata # 3 presentó leucopenia a expensas de linfocitopenia; todas presentaron reticulocitosis y las plaquetas fueron normales en tres de ellas. En el estudio de médula ósea se observó que las ratas # 4 y 6 presentaron ausencia y disminución de megacariocitos respectivamente, así como disminución importante de los elementos maduros y jóvenes, hallazgo característico de la aplasia medular.

En la rata # 5 no pudo llevarse a cabo el estudio de médula ósea por hallarse destruida la muestra. Estas tres ratas (# 4, 5 y 6) presentaron bruscamente signos de choque anafiláctico (cianosis, dificultad respiratoria y convulsiones) inmediatamente después de la inyección subcutánea de la cuarta dosis de benceno puro, falleciendo pocas horas después; los tres animales presentaron hemorragia cerebral en el estudio de necropsia. Otras tres ratas (# 2, 3 y 7) presentaron hemorragia pulmonar de tipo petequiral. Todas las ratas presentaron necrosis cutánea en el sitio de la inyección.

Grupo N° 5 .- (Cuadros 10 y 11). La rata # 3 presentó anemia y plaquetopenia, siendo normales los valores de hemoglobina y plaquetas en el resto del grupo; solo la rata # 1 presentó leucopenia con neutropenia, con cifras normales en el resto del grupo. En todas se observó reticulocitosis. La médula ósea fue normal en todas las ratas; la rata # 3 presentó hemorragia pulmonar leve e i-

C U A D R O N° 6 .- Hallazgos hematológicos en siete ratas del grupo 3 .

RATA	Hb g/100 ml.	Reticu- locitos %	Leucoci- tos mm ³	Neutrófi- los tota- les mm ³	Plaquetas mm ³
1	11.8	12.6	8,140	3,215	96,000
2	12.5	10.8	5,130	1,667	1.232,000
3	11.7	7.0	5,840	2,190	524,000
4	12.8	6.0	8,130	3,048	2.064,000
5	13.3	5.6	6,040	1,510	1.168,000
6	13.2	8.0	5,820	1,309	576,000
7	12.7	5.7	10,280	1,747	792,000

C U A D R O N° 7 .- Resultados de los estudios de médula ósea y de las necropsias practicadas en las siete ratas del grupo 3 .

RATA	Celula- ridad (+)	Megaca- rlocitos (+)	Neutrófi- los madu- ros %	Neutrófi- los jove- nes %	Celulas plasma- ticas %	Necropsia
1	+++	Normales	41	25.5	-	H.P. (*)
2	+++	+++	16	18.7	-	-
3	+++	Normales	31.2	25.5	-	H.P.
4	+++	+++	30	12.7	-	H.P.
5	+++	+++	20	17	-	H.P.
6	+++	+++	29.7	11.5	-	-
7	+++	+++	12.7	9.2	-	-

(+) Incremento estimado por cruces
 (*) Hemorragia pulmonar.

C U A D R O N° 8 .- Hallazgos hematológicos en siete ratas del grupo 4 .

RATA	Hb g/100 ml.	Retícu- locitos %	Leuco- citos mm ³	Neutrófi- los tota- les mm ³	Plaquetas mm ³
1	9.8	18.2	11,800	3,442	672,000
2	12.0	7.0	10,040	2,911	1.792,000
3	12.7	18.8	2,800	1,400	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	12.9	7.6	5.650	1.223	904.000

C U A D R O N° 9 .- Resultados de los estudios de médula ósea y de las necropsias practicadas en siete ratas del grupo 4 .

RATA	Celula- ridad (+)	Megaca- riocitos (+)	Neutrófil los madu- ros %	Neutrófil los jovc- nes %	Celulas plasmá- ticas %	Necropsia
1	+++	+	33.7	16.2	-	-
2	+++	+++	25.7	19.0	-	H.P. (*)
3	++	++	24.0	10.0	-	H.P.
4	Normal	Ausentes	11.7	1.5	-	H.C. (**)
5	Médula destruida	-	-	-	-	H.C.
6	++	Bajos	4.5	1.0	-	H.C.
7	+++	+++	19.7	22.0	-	H.P.

(+) Incremento estimado por cruces.

(*) Hemorragia pulmonar.

(**) Hemorragia cerebral.

C U A D R O N° 10 .- Hallazgos hematológicos en siete ratas del grupo 5 .

RATA	Hb g/100 ml.	Reticu- locitos %	Leucoci- tos mm ³	Neutrófi- los tota- les mm ³	Plaquetas mm
1	13.1	16.4	1,970	886	590,000
2	12.1	12.0	8,240	3,254	1.435,000
3	8.4	11.0	17,080	9,052	203,000
4	12.0	5.2	6,400	1,632	728,000
5	13.5	6.6	8,850	2,259	1.248,000
6	13.8	15.7	8,960	2,508	600,000
7	12.6	9.5	19,080	2,862	928,000

C U A D R O N° 11 .- Resultados de los estudios de médula ósea y de las necropsias practicadas en siete ratas del grupo 5 .

RATA	Celula- ridad (+)	Megaca- riocitos (+)	Neutrófi- los madu- ros %	Neutrófi- los jove- nes %	Celulas plasmá- ticas %	Necropsia
1	+++	Normales	24	14	-	-
2	+++	+++	22.5	27	-	-
3	+++	+++	24.5	26.2	-	H.P. (*)
4	+++	+++	20.7	25.5	-	H.P.
5	+++	+++	28.5	17	-	-
6	+++	+++	22.2	23.7	-	-
7	+++	+++	19.5	12.5	-	-

(+) Incremento estimado por cruces

(*) Hemorragia pulmonar.

2. - Grupo de ratas sometidas a inhalación de benceno .

Los resultados obtenidos en diez ratas sometidas a la administración de benceno por inhalación, pueden observarse en los cuadros N° 11, 12 y 14 .

En los tres cuadros se aprecia que los niveles de hemoglobina en general son moderadamente más elevados que los esperados de acuerdo con los valores normales señalados en el cuadro N° 1. Es posible que ésta discrepancia obedezca, al menos en parte, a la diferencia en altitud sobre el nivel del mar.

En el cuadro N° 12 se aprecia ascenso moderado en la cifra de hemoglobina de las ratas # 1 y 4; ascenso discreto de las cifras de reticulocitos en las ratas # 2 y 3; y finalmente neutropenia durante varias semanas en las ratas # 2 y 4, pudiendo notar que hacia el final del experimento las cifras de neutrófilos habían recuperado el límite normal.

En el cuadro N° 13 se aprecia ascenso muy moderado en las cifras de hemoglobina en las ratas # 5 y 7; y ascenso de reticulocitos en las ratas # 5 y 7 .

En el cuadro N° 14 no se observa modificación importante de la cifra de hemoglobina; los reticulocitos ascendieron ligeramente en las ratas # 8 y 10, y sólo se observa neutropenia en un exámen, en las ratas # 8 y 10.

En resumen, fuera de los periodos de neutropenia en las ratas # 3 y 4, no se observa expresión de los constituyentes de la sangre en éstos experimentos.

Además, podemos señalar los hechos siguientes:

- 1° - El benceno desaparecía totalmente del dispositivo en diez minutos, pero se consideró conveniente prolongar la exposición hasta un total de treinta minutos.
- 2° - En todas las ratas, hacia el final del periodo de inhalación se observó: inquietud, polipnea, y cianosis. Estos datos fueron más intensos en la rata # 1 que presentaba además, incoordinación y búsqueda de una vía de salida.

3º - Se procedió a la determinación de las presiones parciales de O_2 y CO_2 en la sangre de tres ratas en muestras obtenidas por punción cardiaca antes y después de la exposición al benceno. Los resultados se presentan en la Tabla N° 11; conforme a ellos, no hay duda que se produjo hipoxemia e hipercapnia.

T A B L A N° 11 Determinación de las presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono en tres ratas, antes y después de la exposición al benceno

Húmero de la rata	Relación con exposición	Determinación de p O_2 vols. %	Determinación de p CO_2 vols. %
1	Pre-exposición al benceno	55 . 0	28 . 9
	Post-exposición al benceno	26 . 4	38 . 3
2	Pre-exposición al benceno	59 . 0	24 . 0
	Post-exposición al benceno	48 . 0	37 . 4
3	Pre-exposición al benceno	58 . 0	15 . 5
	Post-exposición al benceno	39 . 0	42 . 3

También se practicó determinación de presiones parciales en sangre de las ratas # 2 y 3, antes y después de la inhalación de aire, a objeto de comprobar si durante el transcurso de la prueba, existía un aporte adecuado de oxígeno. Estos últimos resultados se señalan en la Tabla N° 111, y no comprenden a la rata # 1, porque el animal falleció antes de verificarse éste estudio.

T A B L A N.º III Determinación de las presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono en las ratas # 2 y 3 , antes y después de la introducción de ellas a la cámara

Número de la rata	Relación con permanencia en la cámara	Determinación p O ₂ vols. %	Determinación p CO ₂ vols. %
2	Antes de su introducción	51 . 4	18 . 0
	Después de su introducción	36 . 0	19 . 0
3	Antes de su introducción	31 . 2	21 . 4
	Después de su introducción	32 . 0	27 . 2

4º - Fallecieron tres ratas. La rata # 1 murió a la décima semana del experimento en el momento que se le practicaba punción cardíaca; la biopsia de órganos no reveló alteraciones macroscópicas. La rata # 2 falleció en la 12a. semana del estudio, durante la exposición al benceno; la necropsia sólo reveló cianosis intensa sin alteraciones macroscópicas de los órganos. La rata # 9 falleció en la sexta semana del experimento , a los cinco minutos de haber concluido su exposición al tóxico y la necropsia reveló infiltración hemorrágica de pulmones e Intestino delgado, así como zonas pequeñas de proceso inflamatorio con depósito purulento en los pulmones.

5º - Se practicó estudio de médula ósea en tres ratas, y se apreció que no revelaban datos de aplasia medular.

Este último aserto se verifica a través de la lectura de los resultados informados en la Tabla N.º IV .

T A B L A N.º 11. - Resultados de los estudios de médula ósea practicados en tres ratas que se sometieron a inhalación de benceno

Número de la rata	Colu- ridad (+)	Megaca- rionitos (+)	Neutrófi- los madu- ros %	Neutró- filos jóvenes %	Blastos	Células plasmá- ticas %
1	+++	++	50	70	4	-
2	+++	Normales	51.5	20.5	-	-
9	+++	++	43.5	15.8	-	-

(+) Incremento estimado por cruces

CUADRO N° 12 - RESULTADOS REPRESENTATIVOS DE SANGRE PERIFERICA
 OBTENIDOS EN CUATRO RATAS QUE RECIBIERON 150 MGS.
 DE BENZENO / KG. DE PESO / DIA , POR INHALACION

Número de la rata	Tiempo de exposición en semanas	Hb. g/100 ml.	Reticulocitos %	Leucocitos / mm ³	Neutrófilos totales / mm ³	Plaquetas
1	Inicial	14.9	0.6	14,620	3,801	Normales
	1 a.	17.0	0.6	29,320	6,095	"
	3 a.	17.8	3.2	9,300	1,209	"
	4 a.	18.9	1.7	10,810	3,809	"
	7 a.	17.8	2.0	9,240	3,800	"
	10 a.	17.1	1.8	18,080	6,568	"
2	Inicial	15.0	1.7	11,900	3,927	"
	4 a.	15.2	2.4	12,690	2,721	"
	5 a.	14.1	6.2	8,180	1,799	"
	8 a.	16.8	1.2	7,940	1,588	"
	12 a.	15.3	3.4	12,080	1,812	"
	13 a.	15.3	2.8	12,480	3,744	"
3	Inicial	14.6	1.0	11,280	3,030	"
	1 a.	15.7	2.0	7,360	1,164	"
	2 a.	17.4	6.2	7,460	522	"
	3 a.	15.7	0.4	5,800	928	"
	5 a.	14.0	0.6	7,320	2,196	"
	6 a.	15.7	3.2	6,160	800	"
	8 a.	14.6	0	9,420	846	"
	9 a.	15.2	2.4	7,140	357	"
	10 a.	15.3	0.8	8,700	613	"
	12 a.	14.7	2.5	11,560	3,468	"
	15 a.	12.6	3.2	7,620	1,219	"
	19 a.	15.1	1.0	13,260	5,038	"
	26 a.	15.2	1.6	7,020	2,737	"
	4	Inicial	14.0	3.0	9,460	1,513
1 a.		15.0	23.6	4,500	1,170	"
2 a.		14.4	17.2	5,340	480	"
3 a.		16.8	3.0	10,620	3,823	"
4 a.		15.2	8.4	9,560	950	"
5 a.		16.7	4.0	7,920	792	"
6 a.		16.7	5.0	11,940	1,785	"
7 a.		17.7	8.0	10,860	756	"
8 a.		16.0	2.4	7,420	519	"
11 a.		15.7	2.5	13,940	2,648	"
19 a.		16.5	1.8	8,860	1,506	"
26 a.		17.3	-	18,900	-	"

C U A D R O N.º 13 - RESULTADOS REPRESENTATIVOS DE SANGRE PERIFÉRICA OB
TENIDOS EN TRES RATAS QUE RECIBIERON 500 MGS. DE
BENCEÑO / KG. DE PESO / DÍA , POR INHALACION

Número de la rata	Tiempo de exposición en semanas	Hb. g/100 ml.	Reticu-locitos %	Leucoci- tos / mm ³	Neutrófi- los tota- les/mm ³	Plaquetas
5	Inicial	16.4	0.5	14,950	4,554	Normales
	1 a.	-	0	10,950	5,918	"
	4 a.	13.9	0.2	3,720	4,492	"
	8 a.	15.9	1.4	10,120	2,631	"
	12 a.	14.8	1.4	9,440	3,286	"
	14 a.	15.7	-	12,520	-	"
6	Inicial	15.0	2.6	8,800	1,543	"
	1 a.	16.0	1.0	12,520	3,001	"
	4 a.	14.6	0.5	8,880	2,752	"
	10 a.	15.7	2.8	7,020	1,965	"
	12 a.	16.7	1.0	8,200	3,728	"
	14 a.	17.4	-	8,140	-	"
7	Inicial	13.4	1.8	10,300	3,728	"
	1 a.	14.5	2.5	8,400	2,352	"
	4 a.	15.2	1.1	11,540	4,731	"
	10 a.	15.7	4.4	3,780	2,070	"
	13 a.	15.7	2.8	5,340	2,990	"
	15 a.	12.7	-	8,070	-	"

C U A D R O N.º 14 - RESULTADOS REPRESENTATIVOS DE SANGRE PERIFÉRICA OB
TENIDOS EN TRES RATAS QUE RECIBIERON 450 MGS. DE
BENCEÑO / KG. DE PESO / DÍA , POR INHALACION

Número de la rata	Tiempo de exposición en semanas	Hb. g/100 ml.	Reticu-locitos %	Leucoci- tos / mm ³	Neutrófi- los tota- les/mm ³	Plaquetas
8	Inicial	16.1	1.0	11,020	1,543	Normales
	3 a.	17.0	2.4	7,500	2,659	"
	4 a.	15.2	0.5	3,940	1,497	"
	6 a.	15.7	3.0	4,520	-	"
	7 a.	15.5	4.8	3,000	-	"
	11 a.	15.7	3.5	7,320	3,337	"
	14 a.	15.8	-	7,720	-	"
9	Inicial	15.8	2.6	11,100	1,452	"
	4 a.	15.8	3.4	6,920	1,391	"
	5 a.	16.4	1.0	4,520	1,170	"
10	Inicial	15.9	1.2	15,980	1,952	"
	4 a.	14.2	3.6	3,480	2,227	"
	8 a.	16.3	2.5	5,440	1,958	"
	11 a.	15.4	3.2	27,550	1,019	"
	12 a.	-	-	-	6,660	"

COMENTARIOS

El benceno es un hidrocarburo obtenido por medio de la destilación del carbón mineral; se encuentra también en los destilados del petróleo dependiendo su concentración de la composición de petróleo crudo del que deriva (5). El benceno es usado como un solvente del caucho, gomas, resinas, alcaloides, así como en la manufactura de drogas, colorantes y explosivos; es empleado en muchas industrias incluyendo la manufactura de cueros artificiales, cueros naturales, electrometallizado, litografía y aeronáutica. Es una sustancia volátil y por consiguiente, generalmente absorbida por inhalación en habitaciones pobremente ventiladas.

Se ha reconocido al benceno como causante de anemia aplástica fatal desde la descripción de Santesson en 1897. Conocido como un agente mielotóxico, el cuadro clínico de leucopenia, trombocitopenia y anemia severa, representa la forma grave y fatal del envenenamiento por benceno.

La anomalía más común es la anemia, siguiendo en orden de frecuencia la macrocitosis, trombocitopenia, leucopenia, linfocitopenia, reticulocitosis, eosinofilia, elementos inmaduros de la médula ósea en la sangre circulante. También se señaló la producción secundaria de leucocitosis.

Entre otras sustancias derivadas o relacionadas con el benceno se encuentra el hexacloruro de benceno vaporizado (Lindane) (8) insecticidas como el DDT y el clordane (9) y después de la exposición cutánea u oral al querosene (5).

En animales de laboratorio, el benceno produce depresión de la médula ósea y ocasionalmente leucemia; en el ratón, parece actuar por supresión de la síntesis de DNA (6) por las células diferenciadas de la médula ósea y sin alteración de las células indiferenciadas (5). Entre los productos hematológicamente tóxicos en las ratas se encuentran los productos fenólicos derivados del benceno; el difenil y el pirocatequin.

Moeschlin y Speck (6) realizaron un estudio experimental sobre el mecanismo de acción del benceno sobre la médula ósea para lo cual utilizaron conejos como animales de experimentación. En éste trabajo se encontró que puede inducirse

pancitopenia severa empleando benceno puro a dosis de 0.3 ml/kg/día, tres veces por semana; con esta dosis se puede lograr el efecto deseado en todos los animales en periodos de 1 a 9 semanas, excepto en aquellos que mueren por complicaciones anafilácticas o infecciosas tempranas. Cuando se utilizó una inyección única de 2.0 ml. no se produjo ningún cambio notable en la sangre periférica durante un periodo de control de seis semanas. Al obtener efecto tóxico con la dosis mencionada en primera instancia se observó una ligera caída en los linfocitos con un leve aumento en las cifras de basófilos y eosinófilos; al calcular los porcentajes relativos de las diferentes líneas celulares se encontró una disminución de todos los elementos, lo cual fué mas notable en los linfocitos.

A pesar de que todos los conejos tuvieron pancitopenia periférica después de la exposición al benceno se apreció una considerable diferencia en el cuadro morfológico de la médula ósea; de 19 médulas oseas examinadas 4 fueron muy hipoplásticas, 5 con celularidad normal y 4 fueron muy celulares. En éste trabajo no se observó correlación entre la celularidad y la duración de la exposición al benceno. Fué notable la disminución de los precursores mieloides de la médula ósea.

La línea eritroide en general estuvo bien preservada cuantitativamente pero se observaron algunas aberraciones cualitativas caracterizadas principalmente por cambios patológicos en la estructura de la cromatina. También se encontró una desviación a la izquierda en la eritropoyesis con aparición de células muy inmaduras con núcleos gigantes (eritrogonias).

En el presente trabajo, a los grupos 1 y 2 de las ratas en desarrollo inicialmente se les administró el benceno en dosis de 150 ml/kg una vez cada siete días durante tres semanas, y al reconocer que no se produjo aplasia medular se decidió administrar el benceno tres veces por semana. A partir de la segunda semana de vida y utilizando dosis de 150 y 300 ml/kg hasta por nueve ocasiones, se observó aplasia medular sólo en algunos animales aislados.

Además se evidenció muerte súbita en tres ratas del grupo 4, fenómeno que al parecer se debió a choque anafiláctico, después de la inyección subcutánea de benceno.

También cabe señalar que en dos de éstas ratas se encontró aplasia medular.

Se piensa que en el presente trabajo no se obtuvo el éxito que se observa en el trabajo de Moeschlin y Speck, ya que se emplearon como animales de estudio ratas en crecimiento y no conejos, y debido a que las ratas presentan menor desarrollo de la circulación capilar en piel y tejido subcutáneo, se cree que ésta sea la causa de una menor absorción del benceno, además de la presencia de necrosis de la piel, en el sitio de la inyección.

En el grupo de ratas que recibieron el benceno por inhalación se observó que só lamente dos ratas presentaron neutropenia durante algunas semanas, y al final del estudio recuperaron niveles normales.

Los resultados de éste trabajo podrían parecer altamente desalentadores; sin embargo, pensamos que puede ser continuado por dos razones fundamentales:

- (1) La necesidad de un modelo experimental que nos permita eliminar o aceptar a la desnutrición como factor etiológico de la aplasia medular; y :
- (2) La disponibilidad de animales con cuadros de anemia aplástica muy semejantes a los humanos, que nos permitieran hacer estudios sobre patogenia y tratamiento.

Por lo tanto, parece conveniente señalar las causas posibles de la disparidad en los resultados obtenidos en ratas y en conejos.

Ya se mencionó la diferencia en características en la irrigación de la piel en las ratas y conejos. Se puede enunciar en segundo término la presencia de necrosis observada en las ratas, lesión que no está señalada en los conejos, y que podría afectar seriamente la absorción.

La diferencia en la alimentación de las dos especies, de acuerdo con la hipótesis de éste trabajo, podría tener influencia en la resistencia aparente de las ratas al benceno.

El hecho de haber apreciado hipoxia e hipercapnia en el segundo grupo de experimentación, permitió plantear dos posibilidades:

- (a) .- Que las cámaras de inhalación no permitieran la oxigenación adecuada de la rata.
- (b) .- Que el benceno determinara cambios agudos en el aparato respiratorio de las ratas, que interfiriera en alguna forma en el recambio gaseoso.

Para aclarar estas dudas, se hizo un experimento adicional con ratas que fueron introducidas a la cámara sin llegar a administrar el benceno. En estos animales se observó que la presión parcial de O_2 disminuyó de un valor promedio de 51.4 a 36.0 volúmenes por ciento en la rata # 2, mientras que la presión parcial de CO_2 se eleva de un valor promedio de 21 a 27 volúmenes por ciento en la rata # 3.

Debe aceptarse por tanto, que el diseño de la cámara es inadecuado. Tomando como base estas consideraciones pueden plantearse dos hipótesis susceptibles de ser sometidas a trabajo experimental:

Primera .- La diferencia en los resultados obtenidos en ratas y en conejos se debe al distinto régimen de alimentación en las dos especies. Esta hipótesis puede servir para un trabajo experimental en el que, ratas estrictamente comparables, queden sujetas por sorteo, a una dieta que incluya alimentos de origen animal, o a una dieta que contenga alimentos exclusivamente vegetales. Los dos grupos integrados al azar quedarían sometidos a una agresión idéntica por benceno.

Segunda .- El intercambio gaseoso fué tan defectuoso en la cámara diseñada, que no permitió la inhalación de la dosis calculada de benceno. Esta hipótesis puede servir de base a la modificación del sistema experimental de prueba.

CONCLUSIONES

- 1.- La inyección de benceno a treinta y siete ratas por vía subcutánea a dosis y esquemas múltiples, no permitió obtener aplasia de médula ósea en forma previsible y reproducible.
- 2.- La exposición de diez ratas a la inhalación de benceno no provocó aplasia de la médula ósea en forma previsible y reproducible.
- 3.- Dada la necesidad de contar con un modelo experimental de anemia aplásica en ratas, se analizaron las causas de fracaso y se propusieron dos hipótesis que permiten plantear un nuevo trabajo experimental.

R E F E R E N C I A S

- 1.- Dorantes S., Vazquez, J., Soto, R., Toro, A. H., Arias, J., Bello, A., Arias, M., Alvarez, C. y Ajuria, E.: El pronóstico de la anemia refractaria. Bol. Med. Hosp. Infant. (Méx.), 22 : 491, 1965.
- 2.- Dorantes S. : Comunicación personal.
- 3.- Alvarez, A. C., Dorantes, S. y Sedas, T. : Comparación del efecto de dos andrógenos en anemia refractaria. Bol. Med. Hosp. Infant. (Méx.) 26 : 729, 1969.
- 4.- Dorantes, S., Vega, L., Ajuria, M. L., De los Cobos, L., y Solórzano L. Características generales de la anemia refractaria. Por publicarse.
- 5.- Wintrobe, M.M.: Clinical Hematology, 6 th. ed., Lea y Febiger, Philadelphia, 1967.
- 6.- Moeschlin, S. y Speck, B.: Experimental studies on the mechanism of acción benzene on the bone marrow (Radioautographic Studies Using ³H - Thymidine). Acta Haemat., 38 : 104, 1967.
- 7.- Albritton, E. C.: Standard values in blood. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1952.
- 8.- Lage, J. P.: Aplastic Anemia Following Exposure to Bencene Hexacloride. (Lindane). J.A.M.A., 193 : 104, 1965.
- 9.- Erslev, A. J. and Wintrobe, M.M.: Detection and Prevention of Drug - Induced Blood Dyscrasias. J.A.M.A., 181 : 141, 1962.

